

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

FELIPE FACCINI DOS SANTOS

MICOPLASMOSE EM POEDEIRAS, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE  
ISOLADOS E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* COMO FATOR DE RISCO NA QUALIDADE DE  
OVOS COMERCIAIS NO SUDESTE DO BRASIL

NITERÓI, RJ

2015

FELIPE FACCINI DOS SANTOS

**MICOPLASMOSE EM POEDEIRAS, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* COMO FATOR DE RISCO NA QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS NO SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADOR: PROFESSORA DRA. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA - UFF  
COORIENTADOR: PROFESSOR DR. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO - UFF

NITERÓI, RJ  
2015

FELIPE FACCINI DOS SANTOS

**MICOPLASMOSE EM POEDEIRAS, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ISOLADOS E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* COMO FATOR DE RISCO NA QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS NO SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

---

PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA - UFF  
ORIENTADORA

---

PROF. DR. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO - UFF  
COORIENTADOR

---

PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. MARIA LÚCIA BARRETO - UFF

---

DR<sup>A</sup>. NILCE MARIA SOARES - INSTITUTO BIOLÓGICO

---

DR<sup>A</sup>. RITA DE CÁSSIA FIGUEIRA SILVA- PESAGRO-RIO

Niterói, RJ  
2015

À minha esposa, Mariza Dinah Manes Brandão, minha grande companheira na vida pessoal e profissional.

Aos meus pais, Jane Catharina Faccini dos Santos e José Carlos dos Santos, minhas referências de vida e que fizeram possível, pelo seu apoio incondicional, todas as minhas conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, pela convivência, suporte e felicidades proporcionadas, em especial à tia Leny Rosa da Silvae ao meu irmão, Carlos André Faccini dos Santos.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Léo de Almeida Pereira, pelo apoio em todos os momentos, orientação constante dos trabalhos e amizade que permanecerão com projetos futuros em parceria.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela disponibilidade e apoio no desenvolvimento do projeto e nas análises estatísticas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dayse Lima da Costa Abreu pela ajuda durante a realização do experimento.

À Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Figueira da Silva pelo incentivo e auxílio fundamental na revisão dos trabalhos.

À Dr<sup>a</sup>. Nilce Maria Soares pelo apoio durante as coletas nas granjas e discussões sobre o trabalho.

Aos colegas Dr. Leandro Machado, Cátia Cardoso, Mariane Soares e Daniela Sabroza e à Técnica Fernanda Aguiar, pela amizade e grande ajuda na realização do experimento.

Aos colegas da UFF, Dr<sup>a</sup>. Raquel Gouvêa, Dr<sup>a</sup>. Lídia Marques, Camila Serva, Hugo Peralva, Wanda Meira, Thiago Faria, Simone Machado, Juliana Oliveira, Eduardo Nogueira, Beatriz Cardoso, Pedro Panzenhagen, Waldemir Aguiar, Samira Mesquita, Beatriz Frasão, Gabriel Almeida, Vanessa Simas, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nathalie Cunha, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Teixeira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Aquino, Prof. André Muniz, Dr. Môsar Lemos, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Barreto, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Almeida pela sua contribuição.

Ao corpo técnico e administrativo da Faculdade de Veterinária da UFF, em especial, Celeste Menezes e Elizabeth D'andrea, da secretaria do MSV; Willker Menezes do Laboratório de Sanidade Avícola-UFF; Célia da conservação; Dráusio Ferreira, André Veiga e Mariana Oliveira, da secretaria da pós-graduação; Fábio Lopes da manutenção; e Denilson de Carvalho da segurança.

Aos colegas e funcionários da University of Connecticut, pela calorosa receptividade e apoio durante a realização dos trabalhos, em especial ao Dr. Mazhar I. Khan e aos colegas de laboratório Jianping Li e Lu Li.

Aos colegas de quarto durante a estada nos Estados Unidos, pela amizade e suporte, Miguel Colón, Abdiel Rivera, Lance Williams e Kobby Amponsah.

Aos técnicos e proprietários das granjas, que permitiram acesso às suas produções e nos auxiliaram nas coletas de material, possibilitando a realização da pesquisa.

## SUMÁRIO

**RESUMO**, p. 08

**ABSTRACT**, p. 09

**1 INTRODUÇÃO**, p. 10

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 12

2.1 PRODUÇÃO DE OVOS COMERCIAIS NO BRASIL, p. 12

2.2 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO OVO, p. 13

2.2 QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS, p. 14

2.3.1 **Qualidade externa**, p. 14

2.3.2 **Qualidade interna**, p. 16

2.3.3 **Peso de ovos**, p. 17

2.3.4 **Qualidade microbiológica**, p. 18

2.4 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS E A QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS, p. 19

2.4.1 *Mycoplasma synoviae*, p. 22

2.4.2 **Anormalidades no ápice da casca**, p. 24

2.4.3 **Caracterização genotípica dos micoplasmas**, p. 26

**3 DESENVOLVIMENTO**, p. 30

3.1 ARTIGO 1 - Qualidade de ovos comerciais – Uma revisão, p. 30

3.2 ARTIGO 2 - Eggshell Apex Abnormalities in a Free-range Hen Farm with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de Janeiro State, Brazil, p. 43

3.3 ARTIGO 3 - Micoplasmose em poedeiras e *Mycoplasma synoviae* como fator de risco na qualidade de ovos comerciais no sudeste do Brasil, p. 51

3.4 ARTIGO 4 - Use of 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region sequencing for characterization and differentiation of chicken trachea and reproductive tract mycoplasma isolates, p. 68

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**, p. 78

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 79

**6 ANEXO**, p. 93

6.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA, p. 93

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### ARTIGO 2

Table 1 Means ( $\pm$  Standard Deviation) of the results obtained from quality tests of normal and eggs with Eggshell Apex Abnormalities (EAA) collected in a free-range hen farm in Rio de Janeiro – Brazil, p. 49.

Figure 1 A. Egg with rough and thin shell limited to the apex. B. Candling of the egg in Figure 1A, noting an increase on translucency at the apex of the shell. C. Eggs with alterations compatible to eggshell apex abnormalities (EAA), p. 41.

Figure 2 A. Egg with rough and thin shell limited to the apex. B. Candling of the egg in Figure 1A, noting an increase on translucency at the apex of the shell. C. Eggs with alterations compatible to eggshell apex abnormalities (EAA), p. 41.

### ARTIGO 3

Tabela 1 Levantamento da micoplasmose em lotes de poedeiras comerciais por isolamento e PCR no sudeste do Brasil, p. 59.

Tabela 2 Resultados de ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma synoviae* (MS); *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e Bronquite Infecciosa das Galinhas em lotes de poedeiras comerciais no sudeste do Brasil, p. 59.

Tabela 3 Prevalência de Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) em granjas comerciais no sudeste do Brasil, p. 60.

Tabela 4 Valores médios obtidos para os parâmetros de qualidade de ovos normais e com Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) e diferença percentual entre as médias, p. 63.

### ARTIGO 4

Table 1 Flock location where samples were isolated, flock identification, number of the hen, sampling site, species name and sample identification, p. 77.

Figure 1 Dendrogram of *M. gallisepticum* isolates from Brazil, with vaccine and reference strains, constructed by Clustal-W alignment of IGSR sequences by the neighbor-joining method with 1000-bootstrap replicates using MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net>), p. 78.

Figure 2 Representation of differences amongst *M. gallisepticum* isolates from Brazil, vaccine and reference strains. Positions where nucleotide differences exist in one sequence are denoted with the ambiguity setter code according to IUB, p. 79.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EAA	Eggshell Apex Abnormalities – Anormalidades do Ápice da Casca
EFSA	European Food Safety Authority – Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay – Ensaio imunoenzimático
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
IBV	Infectious Bronchitis virus – Vírus da Bronquite Infeciosa das Galinhas
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UH	Unidades Haugh



## RESUMO

O objetivo do estudo foi realizar o levantamento da micoplasmose em poedeiras comerciais na região sudeste do Brasil, caracterização genética de isolados e relacionar essa infecção à qualidade de ovos comerciais. Em todas as granjas estudadas houve a detecção de MS pela PCR e elevada prevalência nos lotes estudados, com 93,3% (14/15) de positividade. Na análise individual, 50,7% das galinhas foram positivas para MS (38/75). À PCR, 1,3% de positividade (1/75) e, ao isolamento, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) foi encontrado em 10,7% (8/75) das galinhas e 36,4% (4/11) das granjas. Dos oito isolados de MG, dois foram identificados como cepas de campo e seis como cepas vacinais pela análise filogenética. Ao analisar os resultados de prevalência de EAA em ovos comerciais, observou-se uma média total de 0,80% dos ovos com a anormalidade, variando de 0,17% a 2,48%. Comparações entre as médias dos parâmetros de qualidade de todos os ovos normais e aqueles com EAA estudados revelaram diferença significativa em quase todos os parâmetros, com exceção da cor da gema. Dentre os parâmetros de qualidade estudados, aquele que mais sofreu influência da EAA foi a força da casca, que teve uma redução média de 23,1%. Foi possível determinar a alta ocorrência de MS pela PCR e pelo ELISA nos plantéis de poedeiras comerciais, assim como detectar MG pelo isolamento e diferenciar as cepas vacinais daquelas de campo, além de identificar isolados de *Mycoplasma gallinaceum* e *M. pullorum* pelo sequenciamento. A ocorrência de MS e a detecção de ovos com EAA nos plantéis de postura comercial na região sudeste do Brasil, sugerem a ocorrência disseminada desta infecção e da lesão nos ovos de plantéis de poedeiras comerciais no sudeste do Brasil, região de maior volume de produção de ovos. Ficou demonstrado que a EAA afeta não só o ápice da casca do ovo, mas também os demais parâmetros de qualidade externa e interna. O sequenciamento da região intergênica 16S-23S rDNA se mostrou uma boa alternativa para a identificação de espécies de micoplasmas isoladas de amostras de campo, com resultados rápidos e confiáveis, a custo relativamente baixo e para tipagem pela sequência de um único locus (single-locus sequence typing – SLST) de isolados de MG.

Palavras-chave: anormalidades no ápice da casca, *Mycoplasma gallisepticum*, prevalência, sequenciamento, região do espaçador intergênico.

## ABSTRACT

The aim of the study was to survey the mycoplasmosis in commercial layers in the southeastern of Brazil, to genetically characterize isolates, and to relate this infection to the quality of commercial eggs. In all studied farms MS was detected by PCR and high prevalence was found in the flocks studied, with 93.3% (14/15) of positivity. By individual analysis, 50.7% of the chickens were positive for MS (38/75). PCR for MG yielded 1.3% positivity (1/75), while by isolation MG was found in 10.7% (8/75) of the chickens and 36.4% (4/11) of the farms. Regarding the eight MG isolates, two were identified as vaccine strains and two as field strains by phylogenetic analysis. When analyzing the results of prevalence of EAA in commercial eggs, there was an overall prevalence of 0.80% of the eggs with the abnormality, ranging from 0.17% to 2.48%. Comparisons between the averages of the quality parameters of all normal eggs and those with EAA studied showed significant differences in almost all parameters, except for the yolk color. Eggshell strength was the most influenced quality parameter by EAA, which had an average reduction of 23.1% on affected eggs. It was possible to determine the high incidence of MS by PCR and by ELISA in laying hen flocks, as well as detect MG by isolation and differentiate vaccine and field strains, also to identify *Mycoplasma gallinaceum* and *M. pullorum* isolates by sequencing. The occurrence of MS and the detection of eggs with EAA in commercial laying flocks in southeastern Brazil, suggest the widespread occurrence of this infection and alterations in eggs in the higher volume in egg production region of the country. Also, it was showed that EAA not only affects the egg shell apex, but also the other external and internal quality parameters. The sequencing of 16S-23S rDNA intergenic region proved to be a good alternative for the identification of *Mycoplasma* species isolated from field samples, with fast and reliable results at relatively low cost. The results were also satisfactory for use in isolated MG strains typing by the single-locus sequence typing method (SLST).

Key words: eggshell apex abnormalities, *Mycoplasma gallisepticum*, prevalence, sequencing, intergenic spacer region.

## 1 INTRODUÇÃO

O ovo de galinha é o produto de origem animal que possui a proteína de maior valor biológico na alimentação humana, além de ser rico em vitaminas e minerais. Apesar do alto valor nutricional e outros benefícios obtidos pelo seu consumo, historicamente o produto não vinha sendo valorizado, por supostamente causar aumento nos níveis de colesterol e das taxas de infarto do miocárdio. Esses conceitos vem sendo modificados por estudos posteriores de grande abrangência que provaram não haver relação destas patologias com o nível de consumo de ovos.

Além dos conceitos errôneos, ainda aceitos por muitos consumidores e profissionais da saúde, a legislação brasileira só exige o controle da qualidade do ovo durante a sua produção e classificação, não havendo parâmetros de avaliação da qualidade mínima para o consumo, como ocorre em outros países.

Provavelmente por estes motivos, o Brasil foi o 64º no ranking mundial de consumo de ovos *per capita* em 2011. Apesar disto, em 2013 foi o sexto maior produtor de ovos comerciais, com produção de 43,43 bilhões de ovos (FAO, 2015). Dentro deste cenário, a região sudeste tem especial destaque, pois somente os estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo corresponderam a 55,38% da produção nacional de ovos comerciais em 2013. O estado do Rio de Janeiro tem produção inexpressiva frente aos demais estados da região, no entanto, participa do circuito de aves e produtos avícolas, sendo importante em relação à epidemiologia das doenças aviárias (UBABEF, 2014).

Alterações na formação do ovo, com comprometimento do tamanho, peso, casca, albume e gema podem ser resultantes da presença de distúrbios fisiológicos ou lesão nos tecidos do sistema reprodutivo das galinhas. Entre as doenças aviárias que causam impacto sobre a produção e a qualidade dos ovos estão as micoplamoses, a bronquite infecciosa, a coriza infecciosa, a doença de Newcastle, a síndrome da queda de postura.

Em relação à micoplasmose, em 2009 foi publicado o primeiro relato da ocorrência de lesões na casca de ovos comerciais denominadas de Anormalidades no Ápice da Casca ou “Eggshell Apex Abnormalities” (EAA), relacionadas com a infecção por *Mycoplasma synoviae* (MS). As anormalidades foram caracterizadas por determinar uma casca áspera e fina, com aumento da translucência, resultando em rachaduras e quebras durante a coleta e o processamento dos ovos.

Localizavam-se na ponta fina do ovo, de até aproximadamente dois centímetros do ápice e quase sempre possuem uma região bem delimitada (FEBERWEE et al., 2009b). A proporção de ovos afetados em um lote variou consideravelmente e, após o primeiro relato, foi registrada a ocorrência de EAA em diversos países (FEBERWEE; LANDMAN, 2008; CATANIA et al., 2010; RANCK et al. 2010; STRUGNELL et al., 2011; KOUTOULIS et al., 2013; JEON et al., 2014). No Brasil foi descrita a ocorrência de EAA em um plantel de aves caipiras no estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2014).

A real prevalência da micoplasmose aviária por MS nas criações avícolas, bem como seus efeitos econômicos, ainda são pouco conhecidos, devido à dificuldade na reprodução da doença e de diagnóstico, aliada a variação de virulência entre as diferentes cepas de MS (NASCIMENTO et al., 2005). Conseqüentemente, o controle e a erradicação de MS têm sido negligenciados, favorecendo sua disseminação, inclusive nos lotes das criações de aves alternativas (SANTOS et al., 2014).

O objetivo do estudo foi realizar o levantamento da micoplasmose em poedeiras comerciais na região sudeste do Brasil, caracterização genética de isolados e relacionar essa infecção à qualidade de ovos comerciais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO DE OVOS COMERCIAIS NO BRASIL

O ovo comercial é um produto de uma eficiente transformação biológica feita pela poedeira. Essa ave é capaz de transformar recursos alimentares de menor valor biológico em um alimento com alta qualidade nutricional para o consumo humano (BERTECHINI, 2003). Até a década de 1970, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) tinha o ovo como referência para estudos de necessidades nutricionais proteicas humanas. Neste período, foi então substituído por uma proteína virtual, uma vez que foi elucidada a necessidade exata de aminoácidos na dieta do homem (SRIKANTIA *et al.*, 1981). Mas ainda persiste o conhecimento de que a proteína da clara do ovo, a albumina, é a que possui maior correspondência entre sua composição de aminoácidos e a necessidade diária do homem, além de ser a proteína que possui melhor digestibilidade.

No passado o consumo de ovos ficou estigmatizado por causar problemas em relação aos níveis de colesterol no sangue humano. Apesar deste mito estar presente no imaginário de muitos leigos e até profissionais da área de saúde, diversos trabalhos científicos já comprovaram que o consumo de ovos não tem relação direta com a ocorrência de doenças cardíacas. Um estudo extremamente relevante, com a participação de mais de 117 mil voluntários, acompanhados durante 8 a 14 anos, sugeriu que o consumo de sete ou mais ovos por semana não trouxe problemas de saúde àquelas pessoas (HU *et al.*, 1999). A partir desses dados uma nova linha de pensamento está sendo desenvolvida, com a utilização de ovos para formulação de dietas para emagrecimento, pois constituem um alimento completo e que gera saciedade, diminuindo o apetite.

Frente a esse novo *status* e aos esforços das organizações de produtores de ovos na melhoria da imagem do produto pelo consumidor, é cada vez maior o consumo deste alimento no Brasil. Em 2010, o brasileiro consumiu 149 ovos/*per capita*/ano e em 2013 atingiu a marca de 169 ovos/*per capita*/ano (UBABEF, 2014). Esse consumo, entretanto, ainda é considerado muito baixo quando comparado com outros países. Segundo dados da International Egg Commission, em 2008, países como França, Itália, Alemanha, Suécia e Estados Unidos já apresentavam um consumo *per capita* anual superior a 200 unidades. Segundo a FAO, o Brasil está

classificado como o 64<sup>o</sup> no ranking mundial de consumo de ovos. Por isso, há grande possibilidade de crescimento para o setor, que pode ser alcançada com ações de marketing e oferta de produtos diversificados e, principalmente, de qualidade. Apesar do baixo consumo *per capita*, quando comparado a outros países, o Brasil foi o sexto maior produtor mundial de ovos comerciais, com produção de 43,43 bilhões de ovos em 2013 (FAO, 2015), sendo 99% desta produção destinada ao consumo interno.

Dentro deste cenário, a região sudeste tem especial destaque, pois somente os estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo corresponderam por 55,38% da produção nacional de ovos comerciais em 2013. O estado do Rio de Janeiro tem produção inexpressiva frente aos demais estados da região, no entanto, participa do circuito de aves e produtos avícolas, sendo importante em relação à epidemiologia das doenças aviárias (UBABEF, 2014).

## 2.2 FORMAÇÃO E ESTRUTURA DO OVO

Nas aves domésticas apenas o ovário e oviduto esquerdos são normalmente funcionais. O termo oviduto descreve a genitália tubular completa da ave fêmea, composta por cinco regiões funcionais: infundíbulo, magno, istmo, útero (glândula da casca) e vagina. Após a ovulação, o ovócito é captado pelo infundíbulo, região aglandular onde ocorre a fertilização quando a galinha é previamente inseminada, e há formação das calazas, que fixam a gema no centro do ovo. No magno há deposição da maior parte das proteínas do albume, formando o albume denso, utilizado nas análises de qualidade. No istmo é secretado o restante das proteínas que forma o albume e a formação das membranas interna e externa da casca. Ao chegar ao útero, a calcificação é iniciada pelos corpos mamilares na membrana externa da casca e fluido é adicionado às proteínas do albume, fazendo o ovo dobrar de tamanho, sendo este o estímulo para que ocorra uma calcificação mais rápida. Ao fim da calcificação, no momento da oviposição, o ovo passa pela vagina e recebe uma camada de mucina que previne a entrada de microrganismos pelos poros da casca (SWENSON; REECE, 1996).

## 2.3 QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS

A qualidade do ovo é medida para descrever as diferenças entre os ovos frescos, que apresentam características relacionadas aos fatores genéticos, nutricionais e ambientais aos quais as galinhas são submetidas, e a deterioração do ovo, durante o período de armazenamento (ALLEONI; ANTUNES, 2001). A preservação da qualidade do ovo durante a manipulação e a distribuição depende do cuidado constante das pessoas envolvidas nestas atividades. Depois da postura, a qualidade do ovo não pode ser melhorada (COUTTS; WILSON, 2007) e perdas na qualidade dos ovos significam grandes prejuízos econômicos. As determinações da qualidade do ovo são separadas como qualidade externa, da casca, e qualidade interna, da clara e da gema.

### 2.3.1 Qualidade externa

A qualidade de casca é um aspecto extremamente importante para a preservação da qualidade e comercialização de ovos. O objetivo da avaliação da qualidade da casca está relacionado principalmente com a sua resistência. Isso porque uma das principais perdas econômicas na produção de ovos ocorre devido às quebras e rachaduras (SOLOMON, 1997). No México, em 2005, foi estimada uma perda entre 30 a 35 milhões de dólares na indústria de ovos, baseada na média de 4% de cascas frágeis com os ovos removidos por possibilidades de ocorrerem trincas e 2,5% de ovos quebrados. Foram contabilizadas apenas perdas entre a postura e embalagem, não contando as perdas no transporte e na exposição ao consumidor (COUTTS; WILSON, 2007). Além das perdas econômicas diretas, as trincas e quebras na casca favorecem a contaminação do produto por microrganismos deteriorantes e patogênicos, aumentando os gastos do país com a saúde pública.

Para a obtenção de uma boa qualidade da casca, deve ser considerado um conjunto de fatores ao longo da vida de uma poedeira, começando pela linhagem, manejo nutricional com níveis adequados de cálcio e fósforo na ração; programa de vacinação, principalmente, para o controle de doenças que afetam a qualidade dos ovos, como a Síndrome da Queda de Postura, Bronquite Infecciosa das Galinhas, Doença de Newcastle e micoplasmoses, entre outras (SESTI; ITO, 2009); além do

controle da temperatura ambiente, pois, o conforto térmico é um dos fatores que influenciam a produção da casca de ovo (OLIVEIRA et al., 2014). Estes autores observaram que a exposição a altas temperaturas ambientais (32°C) levou a alterações no equilíbrio ácido básico das aves, provocando queda acentuada no valor médio da espessura de casca dos ovos. Isso ocorre porque, a galinha provoca uma hiperventilação na tentativa de se resfriar, reduzindo a concentração de CO<sub>2</sub> e ácido carbônico (CO<sub>2</sub> dissolvido em água) sérico, o que dificulta a formação de íons bicarbonato necessários para a formação do carbonato de cálcio, principal componente da casca do ovo.

Para determinar a qualidade externa podem ser avaliados: forma e gravidade específica do ovo, tamanho e peso da casca, percentual, textura, espessura e cor da casca, resistência da casca à quebra. Aspectos relacionados após a formação da casca e da postura, como limpeza e integridade da casca, também são aspectos importantes de qualidade externa que devem ser avaliados. Antes mesmo da classificação dos ovos, é feita uma pré-seleção, excluindo aqueles com excessiva sujidade e quebrados. Durante a ovoscopia é possível avaliar, a textura da casca, o tamanho da câmara de ar, presença de trincas e quebras, falhas na calcificação e partículas de sangue (COUTTS; WILSON, 2007).

Evidentemente, como última etapa na produção do ovo pela galinha, o tamanho da casca será proporcional ao seu conteúdo. O mesmo não ocorre em relação ao peso da casca, o que significa que todo cálcio utilizado para a sua formação precisa ser distribuído por uma superfície maior nos ovos mais pesados. Assim, ovos maiores possuem menor percentual de casca, tornando-os mais frágeis (ROBERTS, 2004). Já foi observado que a resistência é maior em ovos de galinha postos até as 42 semanas de idade, seguida de valores mais baixos de força para romper a casca a partir desta idade (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2002). A forma do ovo também está diretamente relacionada com sua resistência.

Em relação à espessura, foi observado que, em geral, as regiões do ápice, lateral e fundo da casca não apresentam a mesma espessura e, por isso, é importante a análise da média entre os três pontos (BRANDÃO et al., 2014). Cascas mais espessas contribuem para preservação da qualidade interna, pois a perda de umidade e CO<sub>2</sub> para o ambiente é dificultada e, com isso, não ocorrerá alteração do pH interno dos ovos, retardando as reações químicas que degradam o albume ao longo do armazenamento (SOLOMON, 1997).



A qualidade da casca também interfere na qualidade microbiológica do ovo. O principal fator que facilita a penetração bacteriana no ovo é a presença de trincas. O tempo de armazenamento e as condições de temperatura e umidade relativa do ar no ambiente de estocagem por sua vez, influenciam na viabilidade e taxa de multiplicação dessas bactérias (DE REU et al., 2006).

### 2.3.2 Qualidade interna

Para determinar a qualidade interna são avaliados o tamanho e integridade da câmara de ar; pH, percentagem e altura do albume (unidade Haugh - UH); pH, percentagem, altura e cor da gema; e se há presença de manchas no albume e na gema (COUTTS; WILSON, 2007).

De acordo com a legislação brasileira as qualidades internas desejáveis para o ovo são: gema translúcida, consistente, centralizada e sem desenvolvimento de germe; albume transparente, consistente, límpido, com calazas íntegras e sem manchas e tamanho da câmara de ar (BRASIL, 1952).

Na sala de classificação de ovos, é possível observar pela ovoscopia, além das características de qualidade da casca, os parâmetros da qualidade interna em ovos inteiros, pela incidência de um foco de luz. Pode ser visualizada a presença de “manchas de sangue”, como resultado da ruptura de pequenos vasos enquanto o ovo está se formando; e “manchas de carne”, como resultado de descamações do ovário e oviduto ou oxidação da mancha de sangue. Também é possível observar outros defeitos como deslocamento da câmara de ar, podridão, mumificação e rompimento da gema (BRASIL, 1952).

Após a postura, naturalmente, inicia-se o declínio da qualidade interna do ovo e os fatores que mais afetam nesta dinâmica são temperatura, umidade e tempo de armazenamento. As perdas de CO<sub>2</sub> e de umidade ocorrem pelas modificações físico-químicas ocorridas no albume causando a fluidificação do albume e perda de peso do ovo, respectivamente, e são aceleradas em altas temperaturas e baixa umidade relativa no ambiente (COUTTS; WILSON, 2007). A perda de CO<sub>2</sub> pelo ovo é um fenômeno importante para a qualidade. O mesmo está dissolvido no albume na forma de ácido carbônico, que gradativamente vai sendo liberado na forma de gás. A redução da acidez altera o sistema tampão, havendo aumento do pH do albume. A alcalinidade leva a uma alteração na estrutura do gel do albume, com diminuição da

viscosidade, tornando-o fluidificado e com alteração das propriedades organolépticas e tecnológicas do ovo (SCOTT; SILVERSIDES, 2000). Isso acontece pela aproximação do ponto isoelétrico das proteínas do albume com a elevação do pH, com isso menos água fica retida às proteínas, havendo a fluidificação do albume (CARBÓ, 1987). Portanto, à medida que o ovo envelhece, diminui a altura da camada densa, sendo este um dos sinais visíveis da perda de qualidade interna.

Como não se pode comparar a altura do albume de ovos de diferentes tamanhos, foi desenvolvida uma fórmula para corrigir as diferenças e trazer todos os valores a uma mesma escala de comparações, a UH. A escala leva em consideração a altura do albume espesso, o peso do ovo e a constante gravitacional, portanto, quanto maior for o valor desta escala, melhor a qualidade do ovo (EISEN et al., 1962).

O serviço de inspeção de alimentos dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA) adota esta escala como padrão para a classificação dos ovos. Ovos com UH superiores a 72 são classificados como AA; de 71 a 60, como A; de menores que 60, como B (USDA, 2005).

### 2.3.3 Peso de ovos

No Brasil a classificação dos ovos para comércio é feita pelo peso dos ovos. O peso do ovo é um parâmetro de qualidade global, que pode variar conforme a raça e sofre alterações de acordo com a idade da poedeira. Em aves mais velhas, ocorre aumento de até 20% no peso do ovo (SCOTT e SILVERSIDES, 2000; ROBERTS, 2004).

A tipificação de ovos por peso é um método utilizado em todo o mundo, que garante um método fácil para a comercialização de produtos de diferentes faixas de peso em um padrão comum a todos, desde fornecedores ao consumidor final. No Brasil, o ovo comercial é tipificado como Extra (mínimo de 60g/unidade), Grande (mínimo de 55g/unidade), Médio (mínimo de 50g/unidade) e Pequeno (mínimo de 45g/unidade). Os ovos com pesos inferiores a 45g devem ser destinados ao aproveitamento industrial (BRASIL, 1965).

A casca do ovo possui poros que são parcialmente selados pela cutícula, dificultando a penetração de bactérias, mas facilitando as trocas gasosas. Além disso, há passagem de vapor de água do albume para o meio externo, causando a

perda de peso ao longo do tempo de armazenamento. Este processo acontece de forma contínua, logo após a postura, e a velocidade dessas reações também é acelerada pelas temperaturas mais altas de estocagem, assim como pela baixa umidade (VÉRAS et al., 2000).

A perda de peso pode ser verificada pelo aumento da câmara de ar do ovo. Este fenômeno é utilizado pela inspeção brasileira para classificar os ovos. Ovos que possuam até 4mm de altura da câmara de ar são classificados com “A”; altura da câmara de ar até 6mm classifica os ovos como “B”; e altura da câmara de ar até 10mm classifica os ovos como “C” (BRASIL, 1952). No Brasil, praticamente todos os ovos são classificados como “A”, pois passam pelo processo logo após sua produção. Por isso, durante o período de comercialização os ovos tendem a ter a altura da câmara de ar aumentada, mas como foram classificados logo após produção, permanecem com em embalagens indicando a classificação “A”.

#### 2.3.4 Qualidade microbiológica

Como destacado anteriormente, a qualidade externa está diretamente ligada à qualidade microbiológica. Ovos com cascas mais frágeis possuem maior probabilidade de sofrerem trincas, que por sua vez estão mais propensas a terem seu conteúdo contaminado (WIDDICOMBE et al., 2009). Além da qualidade do produto propriamente dito, o modo como os ovos são produzidos, processados e armazenados está também relacionado com sua qualidade microbiológica. A grande maioria dos ovos é estéril no momento da oviposição, quando potenciais fontes de microrganismos como poeira, material do ninho, mãos do granjeiro, esteira de coleta, insetos e fezes os contamina. O número de bactérias presente nos ovos pode ter grandes variações, de zero a centenas ou milhões, e costuma ser de aproximadamente 100.000 por casca de ovos não lavados. Diferentes bactérias, muitos delas potencialmente patogênicas, já foram descritas contaminando ovos como as dos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Proteus*, e *Serratia*. Também foram isoladas bactérias reconhecidamente deteriorantes de alimentos como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, e outras dos gêneros *Proteus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Xanthomonas maltophilia*, *Aeromonas*,

*Enterobacter* e *Achromobacter*. Também já foram identificadas 380 espécies de fungos e leveduras, dentre estas dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (VAN IMMENSEEL et al., 2011).

Em relação à contaminação de ovos por *Salmonella* spp., a quantidade de bactérias inicial logo após a postura não representa risco, uma vez que é estimado que esteja entre 1 a 100 unidades formadoras de colônia (UFC) por ovo. O maior risco é atribuído à multiplicação deste patógeno durante as etapas de processamento, transporte e estocagem. Alguns autores estimam que reduzindo a validade dos ovos para sete dias, ou conservando à temperatura de no máximo 7,7°C, o risco de infecção seria diminuído em 60% (WHO/FAO, 2002). No entanto, a agência de alimentos europeia (*European Food Safety Authority* - EFSA) ao analisar os riscos na quebra da cadeia de frio entre produção e consumo, percebeu que não havia vantagens frente à análise de risco/benefício, devido à ocorrência de trincas e condensação de umidade quando o frio não era mantido (EFSA, 2009).

Outro ponto importante na multiplicação das salmonelas é a idade dos ovos. Em experimento com inoculação de 500 UFC da bactéria no albume de ovos com menos de 28 dias da postura, mantidos a 20 °C por cinco dias, não houve multiplicação significativa da bactéria. Todavia, quando inoculados ovos com 42 dias da postura, sob as mesmas condições, foram detectadas 10<sup>6</sup> UFC. (HUMPHREY; WHITEHEAD, 1993). Em outro estudo, foram analisados 5700 ovos de 15 granjas sabidamente positivas para *Salmonella* spp. Somente 32 ovos estavam contaminados com o patógeno e, destes, apenas três continham mais de 100 bactérias, todos com mais de 21 dias de estocagem em temperatura ambiente (HUMPHREY et al., 1991). Estes resultados levaram a crer que com o tempo de estocagem, poderia haver rompimento parcial da membrana vitelina, liberando conteúdo da gema, gerando um fenômeno de quimiotaxia das bactérias para a gema, com subsequente multiplicação, pois a gema contém todas as moléculas necessárias para a sobrevivência e multiplicação das salmonelas (COGAN et al., 2004).

## 2.4 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS E A QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS

Os micoplasmas são os menores procariontes conhecidos e assemelham-se em tamanho (entre 200 e 400 nm) aos grandes vírus. Estes microrganismos

apresentam algumas particularidades que os diferem das bactérias comuns como crescimento de colônias na forma mamilar ou de ovo frito em ágar, que variam de 0,1 a 1,0 mm de diâmetro quando cultivados em meio sólido; crescimento para dentro do ágar, com início na parte central da colônia; filtrabilidade a 450 nm de poro; neutralização por anticorpos específicos em cultivo, o que permite sua identificação por soroneutralização; e necessidade de colesterol, para o crescimento (RAZIN; TULLY, 1983). Os micoplasmas são desprovidos de parede celular e foram considerados, por muito tempo, parasitas exclusivos do ambiente extracelular. Atualmente, admite-se a existência de espécies de vida intracelular e outras que o fazem opcionalmente.

A ausência de parede celular nos micoplasmas os torna naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam impedindo a síntese da parede celular das bactérias, a exemplo das penicilinas (RAZIN; TULLY, 1995). Apesar da ausência de parede celular, os micoplasmas podem sobreviver sob forma desidratada por vários dias, desde que protegidos da luz solar (CHRISTENSEN et al., 1994) O congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou a liofilização são as melhores formas de manutenção dos micoplasmas, contudo, podem ser mantidos por vários anos em cultivo líquido adicionado de 50% de glicerina, estocados em congelador comum ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1984).

A micoplasmose é considerada uma das doenças respiratórias de maior impacto econômico na Avicultura Industrial. As micoplasmoses aviárias estão entre as enfermidades com prioridade na abordagem no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), pelos prejuízos que causam a atividade avícola e também por representar fator de embargo à exportação dos produtos de origem avícola (BRASIL, 1994; BRASIL, 2001). As três espécies classicamente patogênicas para as aves são MG, MS e *Mycoplasma meleagridis* (MM). As perdas econômicas atribuídas a esses microrganismos são devidas à queda na produção e qualidade dos ovos, à má eclodibilidade (alta mortalidade embrionária), alta taxa de pintos refugos, à queda na eficiência alimentar, às altas taxas de mortalidade e condenação de carcaças e ao alto custo da medicação (KLEVEN, 2003; NASCIMENTO et al., 2005; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

MG, MS e MM têm distribuição mundial e podem causar doenças subclínicas ou aparentes em galinhas, perus e em outras aves (KLEVEN, 2003). Esses organismos têm predileção pelas membranas mucosas e serosas das aves, onde

provocam problemas respiratórios, articulares e urogenitais. Existem várias cepas de MG, MS e MM, diferenciadas fenotípica e genotipicamente, que apresentam graus diferentes de patogenicidade, virulência e imunogenicidade (NASCIMENTO et al., 2005).

A transmissão dos micoplasmas pode ocorrer horizontalmente por aerossóis, durante o acasalamento ou inseminação artificial, por contato direto com outras aves ou contato indireto por intermédio de pessoas, animais, ração, água e equipamentos, ou ainda, pelo ovo, caracterizando a transmissão vertical (KLEVEN, 2003; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Existem duas hipóteses para explicar a transmissão vertical dos micoplasmas em galinhas, ou seja, como se dá a infecção da galinha e conseqüente contaminação dos tecidos reprodutivos e ovo. As hipóteses seriam via bacteremia ou por contato direto dos sacos aéreos com o ovário. Por bacteremia, após a infecção inicial do trato respiratório, o micoplasma ganharia a circulação, atingindo órgãos distantes como os do trato reprodutivo. Na hipótese por contato direto, após infecção inicial do trato respiratório, pelo contato íntimo dos sacos aéreos abdominais com o ovário, haveria a passagem da bactéria para o ovário que, então, contaminaria o restante do trato reprodutivo com a passagem da gema contaminada (ROBERTS; McDANIEL, 1967). Provavelmente as duas formas ocorrem em maior ou menor grau. Em trabalho com infecção experimental do MS, houve maior taxa de recuperação do MS no oviduto quando as aves foram contaminadas pela via traqueal do que pela via intravenosa, no entanto, houve recuperação em ambas (FEBERWEE et al., 2009b).

As lesões e sinais clínicos das micoplasmoses em aves estão primeiramente confinados ao trato respiratório, seguido do sistema articular e, menos frequentemente, de outras regiões do organismo da ave. As doenças classicamente conhecidas são: Doença Crônica Respiratória das galinhas e Sinusite Infecciosa em perus, causadas por MG; Sinovite Infecciosa, causada por MS e aerossaculite em galinhas por MG e MS, além de aerossaculite em perus por MM, MG e MS. As infecções por micoplasmas podem se manifestar de forma aguda, mas normalmente são crônicas, inaparentes, somente evidenciada por análises laboratoriais.

Existem vacinas comerciais inativadas e vivas como medida preventiva contra MG e MS. As vacinas inativadas são indicadas pela inexistência de risco de transmissão para aves não vacinadas, não dificultarem o diagnóstico etiológico e nunca apresentarem problema de reversão de patogenicidade. As vacinas vivas têm

sido usadas como instrumento de exclusão competitiva às cepas de campo nas granjas avícolas com excelentes resultados e são recomendadas para uso em poedeiras comerciais, mas não em reprodutoras (galinhas e perus), para não prejudicar o diagnóstico e o monitoramento epidemiológico (BALÉM et al., 1992; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Além das espécies notadamente patogênicas, existem outras 20 espécies de micoplasmas capazes de infectar aves. São espécies tidas como não patogênicas, no entanto, já foram relatados alguns casos nos quais algumas dessas espécies causaram doenças nas aves. *Mycoplasma imitans* causou doença respiratória quando associado ao vírus da rinotraqueíte e bronquite infecciosa das galinhas (GANAPATHY et al., 1998); *Mycoplasma gallinarum* causou aerossaculite quando associado à vacina contra doença de Newcastle (KLEVEN et al., 1978) e sinais respiratórios com complicações inflamatórias (SILVA et al., 2014); *Mycoplasma gallinaceum* causando efeito sinérgico com MS para sinovite (YAGIHASHI et al., 1993) e com Coriza Infecciosa (GOMES, 2013); e *Mycoplasma pullorum* foi identificado como patogênico para embriões de galinha e peru (MOALIC et al., 1997).

#### 2.4.1 *Mycoplasma synoviae*

Na avicultura moderna, as micoplasmoses aviárias determinadas por MS têm grande importância, devido a sua distribuição e patogenicidade. A infecção por MS ocorre mais frequentemente como infecção subclínica do trato respiratório superior. Também pode ocorrer o quadro sistêmico que resulta em sinovite infecciosa, uma doença de galinhas e perus que vai de aguda a crônica, envolvendo primariamente membranas sinoviais dos ligamentos e bainhas dos tendões produzindo sinovite exsudativa, tenovaginite ou bursite (KLEVEN, 2003).

Nas décadas de 70 e 80, nas infecções por MS, era mais comum o envolvimento articular com sinovite e artrite. Posteriormente, a forma mais comum de micoplasmose se tornou a respiratória (KLEVEN, 2003; NASCIMENTO et al., 2005). As perdas econômicas atribuídas à infecção são imunodepressão temporária, elevação de 1 a 4% da taxa de mortalidade na fase final de produção (SHAPIRO, 1994; DUFOUR-GESBERT et al., 2006), queda de 5 a 10% na postura e de 5 a 7% na eclodibilidade, quadros de doença respiratória (MORROW et al., 1990;

STIPOKVITS; KEMPF, 1996; NASCIMENTO et al., 2005; DUFOUR-GESBERT et al., 2006), bem como diminuição do peso médio e do número de ovos classificados como extra e grande (CATANIA et al., 2010). Ainda, foi observada uma relação direta entre a infecção por MS e consequente produção de ovos com anormalidades no ápice da casca, que gerou menor resistência dos mesmos à quebra (FEBERWEE et al., 2009b).

Ao infectar o hospedeiro, os micoplasmas se fixam a receptores celulares do trato respiratório e mantêm-se intimamente ligado às células, principalmente eritrócitos (LOCKABY; HOERR, 1999). Deste modo, pode ocorrer lise celular pela ação dos anticorpos específicos. Além disso, eles podem ainda estimular a proliferação de linfócitos B e T (poder mitogênico), determinando o aparecimento de infiltrados linfocitários nos tecidos do trato respiratório e das articulações. Em seguida pode ocorrer entre outros, a inibição funcional dos linfócitos T e/ou a produção de linfócitos T citotóxicos, Esse mecanismo pode explicar a imunossupressão temporária da resposta imune humoral e celular durante a infecção (YAMAMOTO, 1990; RAZIN; TULLY, 1995; RAZIN et al., 1998).

Na histopatologia, pode-se observar na infecção respiratória por MS, acúmulo de heterófilos focal ou local, necrose caseosa e infiltrados linfocíticos na lâmina própria da traqueia, parede dos sacos aéreos e ao redor dos brônquios secundários. Ainda podem ser encontradas lesões de pericardite, miocardite multifocal, vasculite e hepatite focal. No comprometimento articular podem ser encontrados infiltrados linfocíticos e de heterófilos na membrana sinovial e tendões flexores, que pode se estender às vísceras como coração, fígado, baço, rins, sacos aéreos e pulmão. Com a evolução da lesão, ocorre necrose e hiperplasia epitelial nas membranas sinoviais e fibrose dos tendões (LOCKABY et al., 1998; KLEVEN, 2003).

A real situação da prevalência da micoplasmose por MS no plantel avícola brasileiro é desconhecida. Para Balen e Fiorentin (1990), desde os anos 80 e, em 1990 a prevalência de MS em frangos aumentou, chegando a ultrapassar a do MG em lotes de reprodutoras. Extraoficialmente, técnicos e produtores tendem a aceitar o comentário de que a grande maioria dos sistemas de produção da moderna avicultura industrial é livre de MG e muitos são positivos para MS (SESTI, 2001; BUIM et al., 2009). A pouca atenção para a infecção por MS foi induzida pela dificuldade na reprodução desta enfermidade em galinhas, grande variação de virulência e de patogenicidade das cepas envolvidas, bem como pela atribuição de



manifestações típicas do MS (anemia hemolítica e imunodepressão temporária) a outros agentes (NASCIMENTO, 2001).

No Brasil, o PNSA promove, entre outras doenças, o controle e/ou erradicação das micoplasmoses, em estabelecimentos avícolas de aves reprodutoras (BRASIL, 2001). A condição de aves livres de micoplasmas tem sido obtida ao longo do tempo pelo tratamento dos plantéis de linhas puras com antimicrobianos dos ovos a serem incubados (NASCIMENTO, 2006). De acordo com o PNSA, linhagens puras, bisavós e avós de galinhas, têm que ser livres de MG e MS. Entretanto, as galinhas matrizes têm que ser livres de MG, mas não de MS. Nesses estabelecimentos avícolas de reprodução está prevista apenas a vigilância, com acompanhamento do MS (BRASIL, 2001). Conseqüentemente, o controle e a erradicação de MS estavam sendo negligenciados, favorecendo sua disseminação, inclusive nos lotes das criações de aves alternativas (MACHADO et al., 2009).

#### **2.4.2 Anormalidades no ápice da casca**

Em 2009 foi publicado o primeiro relato da ocorrência de novas lesões na casca em ovos comerciais denominadas de EAA. Foi descrita a reprodução da nova patologia em aves experimentalmente infectadas com cepa autóctone de MS, comprovando a relação de causalidade entre a infecção pelo MS e o surgimento de EAA. As anormalidades são caracterizadas por determinarem uma casca áspera e fina, com aumento da translucência, resultando em rachaduras e quebras durante a coleta e processamento dos ovos. Localizam-se na ponta fina do ovo, de até aproximadamente dois centímetros do ápice e quase sempre possuem uma região bem delimitada (FEBERWEE et al., 2009b).

Primeiramente esta patologia foi descrita em poedeiras brancas mantidas em gaiolas, mas depois houve a descrição em poedeiras marrons em gaiolas e de ambas as linhagens em outros sistemas de produção (FEBERWEE et al., 2009b). A proporção de ovos afetados em um lote variou de 0,1% a 25%. (FEBERWEE et al., 2009b; CATANIA et al., 2010). EAA também foi relatada em outros países como Japão, África do Sul, Itália, Alemanha, Inglaterra, Chipre e Coreia (FEBERWEE; LANDMAN, 2008; CATANIA et al., 2010; RANCK et al. 2010; STRUGNELL et al., 2011; KOUTOULIS et al., 2013; JEON et al., 2014).

Como a ocorrência de EAA em ovos comerciais é um evento recente, os estudos até o momento foram direcionados na investigação da epidemiologia e etiologia da doença (FEBERWEE et al., 2009b; FEBERWEE et al., 2009a; CATANIA et al., 2010).

Assim como alterações especificamente em uma região do oviduto podem afetar na fisiologia de formação da casca do ovo, causando a EAA, também podem afetar outras regiões ou mesmo a galinha, sistemicamente, determinando alterações em outras regiões da casca, nela como um todo, ou mesmo na formação do albume. Diversos estudos foram realizados para investigar o problema. Inicialmente, dois estudos de campo determinaram a associação entre a infecção do oviduto por MS e a produção de ovos anormais. Subsequentemente, a relação causal entre a infecção dos ovidutos com MS e EAA foi comprovada com a infecção experimental de aves com a cepa de MS isolada dos primeiros estudos. Também foi observado que, independentemente de haver sorologia positiva, somente foi isolado MS de ovidutos de aves que produziram ovos com EAA (FEBERWEE et al., 2009b). A hipótese mais aceita para a causa do problema, corroborada pelos trabalhos de Feberwee et al. (2009b) e Jeon et al. (2014), é de que houvesse uma alteração na camada mamilar da casca que prejudicaria a calcificação do ovo.

Posteriormente, demonstrou-se que a associação com outras doenças como bronquite infecciosa aumentavam a frequência e intensidade do problema. Também ficou demonstrado que a resistência da casca de ovos com EAA foi até 44% menor que a de ovos provenientes de aves não desafiadas por MS, e que ovos normais de aves desafiadas possuíam cascas mais frágeis quando comparadas com as cascas dos ovos de aves não desafiadas (FEBERWEE et al., 2009a).

Em um relato de caso, Catania et al. (2010) observaram correlação positiva entre uma maior taxa de detecção de MS em ovidutos e a taxa de produção de ovos com EAA. Os mesmos autores também relataram diminuição significativa dos ovos com EAA após tratamento com tilosina, melhorando a qualidade de casca e peso médio dos ovos. Feberwee et al. (2009b) já haviam demonstrado que o tratamento com oxitetraciclina havia melhorado a qualidade da casca em lotes com EAA, no entanto, o efeito foi temporário, revelando que a antibioticoterapia não era capaz de eliminar o agente. Catania et al. (2010) detectaram MS pela técnica de PCR da gema de ovos afetados, mas não pela técnica de cultivo. Ranck et al. (2010) detectaram MS no albume em 98% (n=48) dos ovos testados pela técnica de PCR.

A principal causa das perdas econômicas devido à EAA se deve à fragilidade da casca e consequente aumento nas quebras e trincas. Em lotes afetados houve perda de 2 a 3 ovos por galinha e diminuição na postura de ovos de maior tamanho. Estima-se que em um lote com 5% de ovos com EAA haja uma perda de 3% nos ganhos em um período produtivo de 30 a 75 semanas (FEBERWEE; LANDMAN, 2008). Koutoulis et al. (2013) verificaram uma queda na porcentagem de ovos trincados de 3,7% para 1,98% após tratamento e Jeon et al. (2014) verificaram um aumento de 2,6% para 8,3% com a instalação da doença.

#### 2.4.3 Caracterização genotípica dos micoplasmas

A reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction – PCR) foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis e outros. Por esta técnica, é possível multiplicar determinada região do material genético em milhares de cópias, utilizando iniciadores (primers) que se ligam nas duas extremidades dos fragmentos e servem de base para o início da polimerização do DNA. Desta forma desenvolveu-se uma técnica que, além de outras aplicações, serve como método diagnóstico de grande sensibilidade e especificidades, capaz de detectar pequenas quantidades de DNA em uma determinada amostra (WEAVER, 2008). Mais tarde, foram desenvolvidos os testes de PCR para detecção de micoplasmas aviários, como *Mycoplasma gallisepticum* (MG) (NASCIMENTO et al., 1991), *Mycoplasma synoviae* (MS) (LAUERMAN et al., 1998), *Mycoplasma meleagridis* (MM) (ZHAO; YAMAMOTO, 1993a) e *Mycoplasma iowae* (MI) (ZHAO; YAMAMOTO, 1993b).

Uma variação da PCR convencional é a PCR multiplex, que nada mais é que a adição, em uma mesma reação de PCR, dois ou mais pares “primers” capazes de amplificar diferentes regiões do DNA. Já foram desenvolvidos diversos testes de PCR multiplex diversas combinações de “primers” para detecção simultânea de diferentes espécies de micoplasmas. Como exemplos existem testes multiplex para duas cepas de MG, vacinal e de campo (NASCIMENTO et al., 2011); para três espécies, MS, MG e *Mycoplasma gallinarum* (SOARES et al., 2013); e para quatro micoplasmas (MG, MS, MM e MI) (WANG et al., 1997).

Outra variação da PCR convencional é a PCR em tempo real. Nesta técnica a reação de PCR acontece da mesma maneira que ocorre na PCR convencional, inclusive podendo ser utilizado o multiplex (SPYRIGIN et al., 2010; FRAGA et al.,

2013), com a diferença da utilização de marcadores de DNA que medem a amplificação enquanto ocorre, por isso o nome “tempo real”. Existem dois métodos para fazer esta quantificação do DNA, por sonda com marcadores fluorescentes ou por um fluoróforo intercalante de DNA. A sonda no início da reação possui um fluoróforo que está ligado a um bloqueador. É desenhada de modo similar a um primer, que irá ligar em uma região intermediária do produto da PCR. Quando uma nova fita de DNA é produzida, a sonda se liga a esta fita, na próxima reação o processo de polimerização destrói a sonda e libera a substância fluorescente, gerando a fluorescência que é medida pelo equipamento. O fluoróforo intercalante se liga às pontes que são formadas entre as fitas de DNA, indicando a quantidade de material genético. Ou seja, pelos dois métodos, à medida que o material genético é multiplicado há aumento na fluorescência da amostra. No entanto, o segundo método apresenta uma vantagem em relação ao primeiro por ser uma reação reversível. Desta forma, pode ser extraída mais uma informação, a curva de separação das fitas de DNA, o chamado “melting curve” ou curva de melting. Com a separação das fitas, o fluoróforo se desliga da fita de DNA fazendo diminuir a fluorescência, e como a temperatura de separação das fitas de DNA depende do tamanho e conteúdo de nucleotídeos na fita, pode ser inferido pela análise da curva se houveram mudanças no DNA em relação a uma amostra padrão. Portanto, com essa análise é possível em poucas horas saber se há presença ou não de um agente e se este pertence a uma cepa nova ou conhecida (WEAVER, 2008).

O sequenciamento das bases exatas de DNA foi desenvolvido simultaneamente por dois grupos, Sanger e colaboradores e Alan Maxam e Walter Gilbert na década de 1970, com a descrição de dois métodos. O sequenciamento moderno de DNA é derivado do método de Sanger, que consiste na utilização de nucleotídeos marcados terminadores de reação. No método original eram utilizados nucleotídeos radioativos, que eram detectados após corrida de eletroforese em gel de agarose e exposição de filme de raios-X ao gel. Atualmente, os marcadores são substâncias fluorescentes que são detectadas após emissão de luz pelos equipamentos de sequenciamento (WEAVER, 2008).

Além de ser utilizado para conhecer as estruturas que compõe os organismos, o sequenciamento é muito utilizado para detecção de mutações pontuais no genoma. Essas mutações podem indicar alterações na patogenicidade de determinada cepa, se perdeu, ganhou ou teve alterado um determinado fator de

virulência. A análise das mutações também é utilizada para estabelecer uma árvore evolutiva, determinando as distâncias filogenéticas entre cepas isoladas de diferentes regiões, surtos ou mesmo locais de infecção na ave (WEAVER, 2008).

Uma classificação dos isolados de MS pela análise da parte do DNA foi proposta utilizando o gene *vhA*, que traduz dois antígenos de importância, uma lipoproteína (MSPA) e uma hemaglutinina (MSPB) (NOORMOHAMMADI et al., 2000). Como o gene é responsável por determinar um fator de virulência, que promove adesão do microrganismo em determinado tipo celular, e é um gene altamente mutável, observou-se grande utilidade na análise da sua sequência de nucleotídeos ou mesmo da “melting-curve” para estudos epidemiológicos e da diferenciação de cepas de campo da cepa vacinal MS-H (NOORMOHAMMADI et al., 2000; JEFFERY et al., 2007). Na análise comparativa entre as cepas causadoras de EAA e cepas padrão, observou-se diferença tanto nas sequências de nucleotídeos quanto na “melting-curve” (FEBERWEE et al., 2009a). Para a classificação de amostras de MG, Ferguson et al. (2005) descreveram um método com alto poder discriminatório pelo sequenciamento de quatro regiões da bactéria que codificam proteínas de superfície. Posteriormente, Raviv et al. (2007) conseguiram bons resultados pelo sequenciamento de somente uma região, a do espaçador intergênico 16S-23S rDNA.

Pela análise de pequenas alterações, como a de um único nucleotídeo, podemos ter uma resolução muito grande das diferenças que existem entre as bactérias e estabelecer um provável fluxo evolutivo do material genético. Segundo Prof. Lee Riley (informação verbal<sup>1</sup>), “mesmo casos considerados endemias em uma população, podem ser compostas por diversas e pequenas epidemias. Ou seja, quando não conseguimos distinguir bem os agentes causadores de um determinado agravo, todos parecem iguais, assemelhando-se a um quadro de endemia. Mas quando dispomos de ferramentas que separam estes agentes em espécies, cepas, sorotipos, patotipos, genótipos, etc., percebemos que na verdade podem ser diferentes agentes, cada um em seu tempo, portanto, caracterizando quadros isolados de epidemias. Isto é bem percebido nos casos de salmoneloses, pois quando se classificam os casos por sorotipos, é possível se notar grandes variações nos sorotipos causadores de patologias ao longo do ano, por isso, nada mais são

---

<sup>1</sup> Comunicação feita pelo Prof. Lee Riley em 11-12-2013 no Molecular Epidemiology Course, UFF, Niterói.

que diversos eventos epidêmicos, que se forem somente identificados somente ao nível de espécie, se somam, e dão a impressão de se tratar de uma endemia. Deste modo, a utilização da biologia molecular na classificação das cepas de micoplasma pode trazer uma nova perspectiva para entendimento da dinâmica que ocorre nos plantéis de diferentes regiões do Brasil”.

Outra importante ferramenta desenvolvida pelo uso da biologia molecular foi a identificação de espécies de micoplasmas aviários pela caracterização da sequência do espaçador genético existente entre os genes 16S e 23S (RAMÍREZ et al., 2008). Percebeu-se que além do uso para estudo filogenético de cepas de MG (RAVIV et al., 2007), a sequência deste espaçador genético era única para cada espécie de micoplasma aviário, ou seja, sequenciando esta região pode se saber a espécie (RAMÍREZ et al., 2008). Como atualmente o sequenciamento é rápido e a custo acessível, a identificação de espécies por esta técnica se tornou uma boa alternativa aos métodos convencionais, que demandam muito tempo e existência de bancos com soros específicos para todas as espécies a serem testadas.

### **3 DESENVOLVIMENTO**

#### 3.1 ARTIGO 1 - Qualidade de ovos comerciais – Uma revisão

Artigo a ser enviado para o periódico Revista CFMV ISSN 1517-6959, classificado como B5 no Qualis/CAPES.

**ARTIGOS DE REVISÃO E DE EDUCAÇÃO CONTINUADA****QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS – UMA REVISÃO****Felipe Faccini dos Santos - CRMV-AM 0811**

Médico Veterinário

Discente Universidade Federal Fluminense (UFF)

Niterói, RJ

felipefaccini@vm.uff.br

**Haruo Takatani - CRMV-AM 0269**

Médico Veterinário

Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas (ADAF)

Manaus, AM

**Mariza Dinah Manes Brandão - CRMV-AM 0812**

Médica Veterinária

Niterói, RJ

**Virginia Léo de Almeida Pereira - CRMV-RJ 5028**

Médica Veterinária

Docente Universidade Federal Fluminense (UFF)

Niterói, RJ

**RESUMO**

A qualidade do ovo, além dos aspectos econômicos com perdas do produto, defeitos na qualidade pode significar riscos para a saúde pública. Como é um produto rico em nutrientes, pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, quando ocorrem trincas, quebras ou manuseio incorreto. As determinações da qualidade do ovo são separadas como qualidade externa, da casca, e qualidade interna, da clara e da gema. A legislação brasileira classifica os ovos conforme a altura da câmara de ar, mas não determina prazos para sua comercialização. Baseados na falta de legislação específica no Brasil que determine prazos de validade comercial de ovo, nas condições climáticas e mercadológicas próprias dos estados brasileiros, em especial no Norte e Nordeste do Brasil, e até que sejam realizados trabalhos específicos nessas regiões, recomenda-se que as condições de temperatura e umidade em locais de armazenamento sejam monitoradas diariamente; que os ovos sejam comercializados até 28 dias da data da postura, quando estocados em temperatura ambiente; que seja dada a preferência à exposição dos ovos em regiões mais frescas do estabelecimento, como perto de geladeiras de verduras e ilhas de frio; que seja feita a verificação e o recolhimento frequente de caixas que contenham ovos visivelmente alterados, sejam eles trincados ou contaminados por bactérias e fungos e, principalmente, que a presença do médico veterinário em toda a cadeia de produção e comercialização de ovos. Desta forma, poderão ser aplicados os conhecimentos técnicos que garantam ao consumidor um produto de qualidade funcional, nutricional e microbiológica.

Palavras-chave: qualidade interna, qualidade externa, validade, conservação



## TABLE EGG QUALITY– A REVIEW

### ABSTRACT

When we refer to egg quality, besides the economic aspects with product losses, quality defects can pose risks to public health. As a product rich in nutrients, it can promote the development of spoilage and pathogenic microorganisms when there are cracks, breaks or mishandling. The egg quality determinations are divided as external quality, of the shell, and internal quality, of the white and the yolk. Brazilian law classifies eggs according to the height of the air space, but does not determine time limits for their marketing. Based on the lack of specific legislation in Brazil that determine maximum expiry dates for eggs, in their own climate and market conditions of the Brazilian states; especially in the North and Northeast of Brazil; and until specific studies be carried out in these areas, it is recommended that: the conditions of temperature and humidity in storage sites are monitored daily; the eggs are sold up to 28 days from the date of laying, when stored at room temperature; be given preference to exposure of eggs in cooler regions of the establishment, as close to refrigerators of vegetables and cold islands; that the verification and frequent gathering boxes containing visibly altered eggs is made, whether cracked or contaminated by bacteria and fungi; and mainly the presence of the veterinarian in the whole chain of production and marketing of eggs. This way they can be applied technical knowledge to ensure the consumer a product of functional, nutritional and microbiological quality.

Keywords: internal quality, external quality, expiry date, conservation

### INTRODUÇÃO

O ovo comercial é um produto de uma eficiente transformação biológica feita pela poedeira. Essa ave é capaz de transformar recursos alimentares de menor valor biológico em um alimento com alta qualidade nutricional para o consumo humano (BERTECHINI, 2003). Até a década de 1970, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) tinha o ovo como referência para estudos de necessidades nutricionais, que então foi substituído por uma proteína abstrata, uma vez que já se sabia exatamente a necessidade de aminoácidos na dieta do homem (SRIKANTIA *et al.*, 1981). Isso porque a proteína da clara do ovo, albumina, é a que possui maior correspondência entre sua composição de aminoácidos e a necessidade diária do homem, além de ser a proteína que possui melhor digestibilidade.

No passado o consumo de ovos ficou estigmatizado por causar problemas em relação aos níveis de colesterol no sangue. No entanto, apesar deste mito estar presente no imaginário de muitos leigos e até de alguns profissionais, diversos trabalhos científicos já comprovaram que o consumo de ovos não tem relação direta com a ocorrência de doenças cardíacas. Um estudo extremamente relevante que utilizou mais de 117 mil voluntários, acompanhados durante 8 a 14 anos, foi concluído em 1999 e sugeriu que o consumo de sete ou mais ovos por semana não está associado a aumento de risco de doenças coronarianas ou vasculares em homens e mulheres saudáveis (HU *et al.*, 1999). Atualmente existe uma nova linha de pensamento, utilizando esses dados, de ovos na formulação de dietas para emagrecimento, pois é um alimento completo e que gera saciedade, diminuindo o apetite.

Frente a esse novo *status* e aos esforços das organizações de produtores de ovos na melhoria da imagem do produto para o consumidor, é cada vez maior o consumo deste alimento no Brasil, de 149 ovos/*per capita*/ano em 2010 para 169 ovos/*per capita*/ano em 2013 (UBABEF, 2014). Esse consumo, entretanto, ainda é considerado muito baixo quando comparado com outros países. Segundo dados da International Egg Commission, em 2008,

países como França, Itália, Alemanha, Suécia e Estados Unidos já apresentavam um consumo *per capita* anual superior a 200 unidades. O último dado da FAO sobre consumo de ovos nos países foi de 2011 e aponta o Brasil como o 64º, com 8,8 kg/*per capita*/ano. Isso demonstra uma grande possibilidade de crescimento para o setor, que pode ser alcançada com ações de marketing e oferta de produtos diversificados e, principalmente, de qualidade.

A qualidade do ovo é motivo de preocupação não só para as granjas comerciais, mas também para comerciantes e consumidores. Além dos aspectos econômicos com perdas do produto, defeitos na qualidade podem significar riscos para a saúde pública. Como é um produto rico em nutrientes, pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos quando ocorrem trincas, quebras ou manuseio incorreto.

## QUALIDADE DE OVOS

A qualidade do ovo é medida para descrever as diferenças entre os ovos frescos, que apresentam características relacionadas aos fatores genéticos, nutricionais e ambientais aos quais as galinhas são submetidas e a deterioração do produto durante o período de armazenamento (ALLEONI e ANTUNES, 2001). A preservação da qualidade do ovo durante a manipulação e a distribuição depende do cuidado constante das pessoas envolvidas nestas atividades. Depois da postura, a qualidade do ovo não pode ser melhorada (COUTTS e WILSON, 2007) e problemas no armazenamento e transporte até o consumidor podem significar grandes prejuízos econômicos. As determinações da qualidade do ovo são separadas como qualidade externa, da casca, e qualidade interna, da clara e da gema.

### • QUALIDADE EXTERNA

A qualidade de casca é um aspecto extremamente importante para a comercialização de ovos. O objetivo da avaliação da qualidade da casca está relacionado principalmente com a sua resistência. Isso porque uma das principais perdas econômicas na produção de ovos ocorre devido às quebras e rachaduras (SOLOMON, 1997). No México, em 2005, foi estimada uma perda entre 30 a 35 milhões de dólares na indústria de ovos, baseada na média de 4% de cascas frágeis com os ovos removidos por possibilidades de ocorrerem trincas e 2,5% de ovos quebrados. Foram contabilizadas apenas perdas entre a postura e embalagem, não contando as perdas no transporte e na exposição ao consumidor (COUTTS e WILSON, 2007). Além das perdas econômicas diretas, as trincas e quebras na casca favorecem a contaminação do produto por microrganismos deteriorantes e patogênicos, aumentando os gastos do país com a saúde pública.

Para a obtenção de uma boa qualidade da casca, deve ser considerado um conjunto de fatores ao longo da vida de uma poedeira, começando pela linhagem, manejo nutricional com níveis adequados de cálcio e fósforo na ração; programa de vacinação, principalmente, para o controle de doenças que podem afetar a qualidade dos ovos, como a Síndrome da Queda de Postura, Bronquite Infecciosa das Galinhas, Doença de Newcastle e micoplasmoses, entre outras (SESTI e ITO, 2009); além do controle da temperatura ambiente, pois o conforto térmico é um dos fatores que influenciam a produção da casca de ovo (OLIVEIRA et al., 2014). Estes autores observaram que a exposição a altas temperaturas ambientais (32°C) levou a alterações no equilíbrio ácido básico das aves, provocando queda acentuada no valor médio da espessura de casca dos ovos. Isso ocorre porque, a galinha provoca uma hiperventilação na tentativa de se resfriar, reduzindo a concentração de CO<sub>2</sub> e ácido carbônico (CO<sub>2</sub> dissolvido em água) sérico o que dificulta a formação de íons bicarbonato necessários para a formação do carbonato de cálcio, principal componente da casca do ovo.

Para determinar a qualidade externa podem ser avaliados: forma e gravidade específica do ovo; tamanho e peso da casca; percentual, textura, espessura e cor da casca; resistência da casca à quebra. Aspectos relacionados após a formação da casca e da postura, como limpeza e integridade da casca, também são aspectos importantes de qualidade externa que devem ser avaliados.

Antes mesmo da classificação dos ovos, é feita uma pré-seleção, excluindo aqueles com excessiva sujidade e quebrados. Durante a ovoscopia é possível avaliar a textura da casca, o tamanho da câmara de ar, presença de trincas e quebras, falhas na calcificação e partículas de sangue.

Evidentemente, como é a última etapa na produção do ovo pela galinha, o tamanho da casca será proporcional ao seu conteúdo. Porém, o mesmo não ocorre em relação ao peso da casca, o que significa que todo cálcio utilizado para formação da casca do ovo precisa ser distribuído por uma superfície maior nos ovos mais pesados. Assim, ovos maiores possuem menor percentual de casca, tornando-os mais frágeis (ROBERTS, 2004). Já foi observado que a resistência é maior nos ovos de galinhas com até as 42 semanas de idade, seguida de valores mais baixos de força para romper a casca em ovos postos a partir desta idade (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2002). A forma do ovo também está diretamente relacionada com sua resistência.

Em relação à espessura, foi observado que, em geral, as regiões do ápice, lateral e fundo da casca não apresentam a mesma espessura e, por isso, é importante a análise da média entre os três pontos (BRANDÃO et al., 2014). Cascas mais espessas contribuem para preservação da qualidade interna, pois a perda de umidade e CO<sub>2</sub> para o ambiente é dificultada e, com isso, não ocorrerá alteração do pH interno dos ovos, retardando as reações químicas que degradam o albume ao longo do armazenamento (SOLOMON, 1997).

A qualidade da casca também interfere na qualidade microbiológica do ovo. Os principais fatores que facilitam a penetração bacteriana no ovo são: a presença de defeitos de casca, o tempo de armazenamento e as condições de temperatura e umidade relativa do ar no ambiente de estocagem (DE REU, 2006).

#### • QUALIDADE INTERNA

Para determinar a qualidade interna são avaliados o tamanho e integridade da câmara de ar; pH, percentagem e altura do albume (Unidade Haugh - UH); pH, percentagem, altura e cor da gema; e se há presença de manchas no albume e na gema (COUTTS e WILSON, 2007).

De acordo com a legislação brasileira a qualidade interna desejável para o ovo inclui: gema translúcida, consistente, centralizada e sem desenvolvimento de germe; albume transparente, consistente, límpido, com calazas íntegras e sem manchas e tamanho da câmara de ar (BRASIL, 1952).

Na sala de classificação de ovos, é possível observar pela ovoscopia, além das características de qualidade da casca, os parâmetros da qualidade interna em ovos inteiros, pela incidência de um foco de luz. Pode ser visualizada a presença de “manchas de sangue”, como resultado da ruptura de pequenos vasos enquanto o ovo está se formando; e “manchas de carne”, como resultado de descamações do ovário e oviduto ou oxidação da mancha de sangue. Também é possível observar outros defeitos como deslocamento da câmara de ar, podridão, mumificação e rompimento da gema (COUTTS e WILSON, 2007).

Após a postura, naturalmente, inicia-se o declínio da qualidade interna do ovo e os fatores que mais afetam nesta dinâmica são temperatura, umidade e tempo de armazenamento. As perdas de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e de umidade ocorrem pelas modificações físico-químicas ocorridas no albume causando a fluidificação do albume e perda de peso do ovo,

respectivamente, e são aceleradas em altas temperaturas e baixa umidade relativa no ambiente (COUTTS e WILSON, 2007).

A perda de CO<sub>2</sub> pelo ovo é um fenômeno importante para a qualidade, pois está dissolvido no albume na forma de ácido carbônico, que gradativamente vai sendo liberado na forma de gás. A redução da acidez altera o sistema tampão, havendo aumento do pH do albume. A alcalinidade leva a uma alteração na estrutura do gel do albume, com diminuição da viscosidade, tornando-o fluidificado e com alteração das propriedades organolépticas e tecnológicas do ovo (SCOTT e SILVERSIDES, 2000). Isso acontece pela aproximação do ponto isoelétrico das proteínas do albume com a elevação do pH, com isso menos água fica retida às proteínas, havendo a fluidificação do albume (CARBÓ, 1987). Assim, à medida que o ovo envelhece, diminui a altura da camada densa, sendo este um dos sinais visíveis da perda de qualidade interna.

Como não se pode comparar de alturas de albume de ovos com diferentes tamanhos, foi desenvolvida uma fórmula para corrigir as diferenças e trazer todos os valores a uma mesma escala de comparações, a UH. A escala leva em consideração a altura do albume espesso, o peso do ovo e a constante gravitacional, e quanto maior for o valor desta escala, melhor a qualidade do ovo (EISEN et al., 1962).

O serviço de inspeção de alimentos dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA) adota esta escala como padrão para a classificação dos ovos. Ovos com UH superiores a 72 são classificados como AA; de 71 a 60, como A; de menores que 60, como B (USDA, 2000).

#### • PESO DE OVOS

No Brasil a classificação dos ovos para comércio é feita pelo peso dos ovos. O peso do ovo é um parâmetro de qualidade global, que pode variar conforme a raça e sofre alterações de acordo com a idade da poedeira. Em aves mais velhas, ocorre aumento de até 20% no peso do ovo (SCOTT e SILVERSIDES, 2000; ROBERTS, 2004).

A tipificação de ovos por peso é um método utilizado em todo o mundo, que garante um método fácil para a comercialização de produtos de diferentes faixas de peso em um padrão comum a todos, desde fornecedores ao consumidor final. No Brasil, o ovo comercial é tipificado como Extra (mínimo de 60g/unidade), Grande (mínimo de 55g/unidade), Médio (mínimo de 50g/unidade) e Pequeno (mínimo de 45g/unidade). Os ovos com pesos inferiores a 45g devem ser destinados ao aproveitamento industrial (BRASIL, 1965).

A casca do ovo possui poros que são parcialmente selados pela cutícula, dificultando a penetração de bactérias, mas facilitando as trocas gasosas. Além disso, há passagem de vapor de água do albume para o meio externo, causando a perda de peso ao longo do tempo de armazenamento. Este processo acontece de forma contínua, logo após a postura, e a velocidade dessas reações também é acelerada pelas temperaturas mais altas de estocagem, assim como pela baixa umidade (VÉRAS et al., 2000).

A perda de peso pode ser verificada pelo aumento da câmara de ar do ovo. Este fenômeno é utilizado pela inspeção brasileira para classificar os ovos. Ovos que possuam até 4mm de altura da câmara de ar são classificados com “A”; altura da câmara de ar até 6mm classifica os ovos como “B”; e altura da câmara de ar até 10mm classifica os ovos como “C” (BRASIL, 1952). No Brasil, praticamente todos os ovos são classificados como “A”, pois passam pelo processo logo após sua produção, uma vez que não é tradição no Brasil a estocagem de ovos. Por isso, durante o período de comercialização os ovos tendem a ter a altura da câmara de ar aumentada, mas como foram classificados logo após produção, permanecem com em embalagens indicando a classificação “A”.

- **ANÁLISE SENSORIAL**

Outra ferramenta para realizar a avaliação de ovos é a Análise Sensorial. Análise Sensorial é a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais, como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993). Esta ferramenta já está incluída na legislação de inspeção de ovos quando se coloca que o ovo é impróprio para o consumo quando apresenta cor, odor e sabor anormais (BRASIL, 1952). Entretanto, mais do que simples parâmetros para condenação de ovos impróprios ao consumo, atualmente a análise sensorial tem sido empregada no desenvolvimento de novos produtos, como na avaliação de sabor de ovos alternativos (MIZUMOTO et al., 2008; SANTOS et al., 2012) e efeitos da inclusão de ácidos graxos ômega-3 no sabor dos ovos (LAWLOR, et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

### **ARMAZENAMENTO DE OVOS COMERCIAIS**

A temperatura e a umidade relativa do ar são os fatores mais importantes, que afetam a qualidade dos ovos, durante o armazenamento. Quanto maior for a temperatura, maior será a velocidade da perda de qualidade interna, em um determinado tempo de estocagem, com a perda de CO<sub>2</sub> e umidade (SCOTT e SILVERSIDES, 2000). Além de ser perdida através dos poros, parte da umidade passa para a gema durante o período de armazenamento do ovo, devido a maior pressão osmótica da mesma. O excesso de água na gema ocasiona um aumento, levando a um enfraquecimento da membrana vitelínica (LEANDRO et al., 2005).

Diversos autores investigaram a influência da temperatura e tempo durante a estocagem na evolução dos valores de UH. Alleoni e Antunes (2001) constataram que a UH diminuiu de 83,66 no dia da postura para 41,71 quando armazenados durante sete dias a uma temperatura de 25°C. Samli et al. (2006) verificaram que ovos estocados por 10 dias tiveram uma queda na UH de 91,37 para 76,27; 53,74 e 40,57 quando estocados a 5°C, 21°C e 29°C, respectivamente. Nesse trabalho, o ovo mantido apenas por dois dias à temperatura de 29°C teve menores valores de UH (64,84) que aqueles mantidos por 10 dias a temperatura de 5°C (76,27). Em trabalho similar, Jin et al. (2011) observaram diferenças após 10 dias de estocagem da UH de 88,79 para 87,63 à temperatura de 5°C, enquanto para a temperatura de 29°C verificou-se uma queda de 87,62 para 60,92. Outro dado interessante foi que mesmo na temperatura intermediária de 21°C, bastaram dois dias para que a queda no valor de UH fosse superior ao da estocagem por 10 dias a 5°C. Segundo consta no Manual de Classificação de ovos dos Estados Unidos (USDA, 2005), um dia com o ovo em temperatura ambiente equivale a uma semana do ovo refrigerado.

Estes dados são muito importantes ao se analisar o risco à qualidade dos ovos que são estocados e comercializados em regiões de temperaturas elevadas, como Norte ou Nordeste. Por exemplo, a cidade de Manaus/AM, que possui temperatura média de 26,7°C e temperatura máxima média de 31,4°C (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2015).

- **CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO NO BRASIL E NO MUNDO**

A legislação brasileira classifica os ovos conforme a altura da câmara de ar, mas não determina prazos para sua comercialização (BRASIL, 1991). A Portaria nº01/90 do MAPA, traz duas definições no que tange à conservação dos ovos, o mesmo pode ser definido como “Ovo fresco” ou “Ovo frigorificado”. Para o “Ovo fresco” não se admite qualquer processo de conservação, mas se refere na verdade ao processo de resfriamento, pois recomenda o armazenamento destes ovos a uma temperatura entre 8°C e 15°C com umidade relativa do ar

entre 70 a 90% e, caso seja armazenado à temperaturas inferiores a 8°C, o ovo perde esta classificação. “Ovo refrigerado” é aquele que seja armazenado à temperatura de 0°C a 1°C (BRASIL, 1990). A Portaria também não define prazos máximos para comercialização destes ovos.

Como não há legislação que exija a refrigeração dos ovos comerciais para venda em comércio e não há prazo de validade máximo estabelecido, a maior parte desse produto é mantida em temperatura ambiente, desde a produção até a distribuição final.

#### - Estados Unidos da América

Devido à grande preocupação com a ocorrência de salmoneloses, o setor responsável pela segurança dos alimentos dos Estados Unidos (US Food and Drug Administration - FDA) determinou que todos os ovos fossem refrigerados até no máximo 36 horas após a postura à temperatura máxima de 15,6°C para ovos ainda não processados e de 7,2°C para ovos processados. O USDA também obriga os produtores a colocar data de validade nas caixas de ovos, que deve ser de no máximo 15 dias para ovos AA e 30 dias para ovos A e B, a partir do dia de embalagem (USDA, 2005).

#### - EUROPA

A Europa classifica seus ovos de modo similar ao brasileiro, em relação ao tamanho da câmara de ar. A ordem de classificação é dada por “A extra”, “A” e “B”, ovos com altura da câmara de ar de 4mm, 6mm e 8mm, respectivamente. Porém, além desta classificação, os ovos devem ter datas máximas de validade de nove dias para ovos “A extra” e de 28 dias para os demais, contados a partir do dia da postura. A legislação europeia diverge da americana em relação à refrigeração dos ovos, pelo risco de trincas e quebras da casca caso a cadeia de frio fosse interrompida em algum ponto. No entanto, há possibilidade de manter ovos da classe “B” sob refrigeração, se mantidos a no máximo 5°C (CE, 2008).

#### - OUTROS PAÍSES

A legislação da Nova Zelândia determina uma validade de 35 dias, se os ovos forem mantidos a uma temperatura de até 15°C, e de 21 dias, se mantidos em temperaturas superiores a esta, contados a partir do dia da postura (NZFSA, 2009).

No México, os ovos frescos devem ser consumidos em até 15 dias. Para ovos refrigerados, com temperatura máxima de 7°C, não há limite de dias de armazenamento, mas somente podem ser consumidos se a câmara de ar não ultrapassar 9mm. O último critério para consumo também é aplicado para ovos frescos (MÉXICO, 1996).

No Chile, denomina-se “ovos frescos” aquele que forem armazenados por até oito dias e a câmara de ar não pode ultrapassar 8mm; “ovos conservados” são aqueles armazenados por até 30 dias refrigerados ou em local fresco; e “ovos refrigerados” são aqueles que podem ser armazenados por mais de 30 dias, desde que permaneçam à até 2°C, que o pH da clara e gema não seja maior que 8,8 e 6,9, respectivamente, e a câmara de ar não ultrapasse 10mm (CHILE, 1997).

## SEGURANÇA DO ALIMENTO

Além da qualidade do produto propriamente dito, o modo como os ovos são produzidos, processados e armazenados está também relacionado com sua qualidade microbiológica. A grande maioria dos ovos é estéril no momento da oviposição, quando potenciais fontes de microrganismos como poeira, material do ninho, mãos do granjeiro, esteira de coleta, insetos e fezes os contamina. O número de bactérias presente nos ovos pode ter grandes variações, de zero a centenas ou milhões e costuma ser de aproximadamente

100.000 por casca de ovos não lavados. Diferentes bactérias, muitos delas potencialmente patogênicas, já foram descritas contaminando ovos como as dos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Proteus*, e *Serratia*. Também foram isoladas bactérias reconhecidamente deteriorantes de alimentos como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas maltophilia*, e outras dos gêneros *Proteus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Enterobacter* e *Achromobacter*. Também já foram identificadas 380 espécies de fungos e leveduras, dentre estas dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (VAN IMMERSSEL et al., 2011).

Em relação à contaminação de ovos por *Salmonella* spp., a quantidade de bactérias inicial logo após a postura não representa risco, uma vez que é estimado que esteja entre 1 a 100 unidades formadoras de colônia (UFC) por ovo. O maior risco é atribuído à multiplicação deste patógeno durante as etapas de processamento, transporte e estocagem. Autores estimam que reduzindo a validade dos ovos para 7 dias, ou conservando à temperatura de no máximo 7,7°C, o risco de infecção seria diminuído em 60% (WHO/FAO, 2002). No entanto, a agência de alimentos europeia (European Food Safety Authority - EFSA) ao analisar os riscos na quebra da cadeia de frio entre produção e consumo, percebeu que não havia vantagens frente à análise de risco/benefício, devido à ocorrência de trincas e condensação de umidade quando o frio não era mantido (EFSA, 2009).

Outro ponto importante na multiplicação das salmonelas é a idade dos ovos. Em experimento com inoculação de 500 UFC da bactéria no albume de ovos com menos de 28 dias da postura, mantidos a 20 °C por cinco dias, não houve multiplicação significativa da bactéria. Todavia, quando inoculados ovos com 42 dias da postura, sob as mesmas condições, foram detectadas 106 UFC. (HUMPHREY; WHITEHEAD, 1993). Em outro estudo, foram analisados 5700 ovos de 15 granjas sabidamente positivas para *Salmonella* spp. Somente 32 ovos estavam contaminados com o patógeno e, destes, apenas três continham mais de 100 bactérias, todos com mais de 21 dias de estocagem em temperatura ambiente (HUMPHREY et al., 1991). Estes resultados levaram a crer que com o tempo de estocagem, poderia haver rompimento parcial da membrana vitelina, liberando conteúdo da gema, gerando um fenômeno de quimiotaxia das bactérias para a gema, com subsequente multiplicação, pois a gema contém todas as moléculas necessárias para a sobrevivência e multiplicação das salmonelas (COGAN et al., 2004).

### 2.3.4 Doenças que afetam na qualidade dos ovos

Algumas doenças das aves estão classicamente relacionadas por causar problemas diretamente na qualidade dos ovos, são elas a Bronquite Infeciosa das Galinhas (IBV), Síndrome da Queda de Postura (EDS), Doença de Newcastle (ND) e as micoplasmoses.

A IBV causa alterações inflamatórias em todo oviduto e, por isso, os ovos produzidos por galinhas doentes apresentam alterações na qualidade interna, com albume líquido, e externa, com cascas rugosas, deformadas, finas, despigmentadas ou até mesmo sem casca. A EDS causa problemas semelhantes à IBV com relação à qualidade da casca, no entanto, estudos divergem sobre a possibilidade de causar problemas na qualidade interna. A ND pode causar hemorragias no trato reprodutivo devido à intensa resposta imunológica, que resultam principalmente em problemas de casca (SAIF, 2003).

Nas micoplasmoses, a infecção pelo *Mycoplasma gallisepticum* (MG) sempre gerou preocupação entre os produtores por diversos prejuízos causados e, por isso, é feita a vacinação com cepas vivas na maioria das criações. Entretanto, atualmente a infecção pelo *M. synoviae* (MS) tem recebido destaque, pois recentemente foi relatada uma nova patologia

afetando ovos e que gera especificamente fragilidade na casca, causando prejuízos principalmente pelo aumento na perda de ovos trincados e quebrados (FEBERWEE et al., 2009; SANTOS et al., 2014). A micoplasmose por MS se torna ainda mais preocupante pelo fato da bactéria ser altamente prevalente nos plantéis nacionais (SANTOS, 2015).

## CONCLUSÃO

Considerando os fatos apresentados, a falta de legislação específica no Brasil que determine prazos de validade comercial de ovo, as condições climáticas e mercadológicas atuais próprias dos estados brasileiros, em especial no Norte e Nordeste do Brasil, até que sejam realizados trabalhos específicos nessas regiões, recomenda-se:

- que sejam monitoradas diariamente as condições de temperatura e umidade em locais de armazenamento;
- que os ovos sejam comercializados até 28 dias da data da postura, quando estocados em temperatura ambiente;
- que seja dada a preferência à exposição dos ovos em regiões mais frescas do estabelecimento, como perto de geladeiras de verduras e ilhas de frio;
- que seja feita a verificação e o recolhimento frequente de caixas que contenham ovos visivelmente alterados, sejam eles trincados ou contaminados por bactérias e fungos.

É de suma importância a presença do médico veterinário em toda a cadeia de produção e comercialização de ovos. Desta forma, poderão ser aplicados os conhecimentos técnicos que garantam ao consumidor um produto de qualidade funcional, nutricional e microbiológica.

## REFERÊNCIAS

ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovoide galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 4, p. 681-85, 2001.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas** - Terminologia - NBR 12806. São Paulo: ABNT, 1993.

BERTECHINI, A. G. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. *In*: Conferência APINCO 2001 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003, Santos. Anais.... Santos: FACTA, 2003, v. 1, p. 19-26.

BRANDAO, M.D.M.; SANTOS, F.F.; MACHADO, L.S.; SOARES, M.V.; OLIVEIRA, J.M.; SOARES, N.M.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. The effect of eggshell apex abnormalities on table egg quality during storage in 2 seasons of the year. **Poultry Science**, v. 93, p. 2657-2662, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº30.691, de 29 de março de 1952, e alterações. **Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. [Diário Oficial da União], Brasília, DF, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 56.585, de 20 de Julho de 1965. **Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização do ovo**. [Diário Oficial da União], Brasília, DF, 1965.



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. **Aprova as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados**. [Diário Oficial da União], Brasília, DF, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 5, de 05 de julho de 1991. **Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral**. [Diário Oficial da União], Brasília, DF, 1991.

CAMERINI, N.L. **Qualidade dos ovos de aves poedeiras comerciais submetidas a três condições ambientais em dois sistemas de criação**. Campina Grande – PB, 2012. 115f. Tese (Engenharia Agrícola)- Centro de tecnologia e recursos naturais, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2012.

CARBÓ, C.B. **La gallina ponedora**. Madrid, Espanha: Ediciones Mundi-Prensa, 1987. 519 p.

CE - COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 589/2008 da comissão de 23 de junho de 2008. **Estabelece as regras de execução do Regulamento (CE) No. 1234/2007 do Conselho no que respeita às normas de comercialização dos ovos**. [Jornal Oficial da União Europeia], L 163/6, 24 de junho de 2008.

CHILE. Ministerio de Salud. **Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO. N° 977/96**. Diario Oficial de 13 de maio de 1997.

COUTTS, J.A.; WILSON, G.C. **Optimum egg quality: a practical approach**. Sheffield (Reino Unido): 5M Publishing. 2007. 64p.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 253-260, 2006..

EFSA – European Food Safety Authority, 2009. Special measures to reduce the risk for consumers through *Salmonella* in table eggs – egg cooling of table eggs (Question No EFSA-Q-2007-198) Adopted on 22 January 2009. **EFSA Journal**. v. 957, p. 1-29.

EISEN, E. J.; BOHREN, B.B.; MCKEAN, H.E.. 1962. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. **Poultry Science**, v. 41, p.1461-1468.

HU, F.B.; STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B.; MANSON, J.E.; ASCHERIO, A.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.A.; SPIEGELMAN, D.; SPEIZER, F.E.; SACKS, F.M.; HENNEKENS, C.H.; WILLETT, W.C. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. **JAMA**, v. 281, n. 15, p. 1387-1394, 1999.

JIN, Y. H.; LEE, K. T.; LEE, W. I.; HAN, Y. K.. Effects of storage temperature and time on the quality of eggs from laying hens at peak production. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.24, n. 2, p.279-284, 2011.

LAWLOR, J. R.; GAUDETTE, N.; DICKSON, T; HOUSE, J. D. Fatty acid profile and sensory characteristics of table eggs from laying hens fed diets containing microencapsulated fish oil. *Animal Feed Science and Technology*, v. 156, n. 3-4, p. 97-103, 2010.

LEANDRO, N.S.M.; DEUS, H.A.B.; STRINGHINI J.H.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A.; CARVALHO, F.B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, n. 2, p. 71-78, abr./jun. 2005.

MÉXICO. Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana NOM-159-SSA1-1996, Bienes y Servicios. **Huevo, sus productos y derivados**. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Disponível em: < <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/159ssa16.html> >.

MIZUMOTO, E. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MACHADO F. M. V. F. Avaliação química e sensorial de ovos obtidos por diferentes tratamentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 60-65, 2008.

NZFSA – New Zealand Food Safety Authority. **Food Labelling Requirements for Eggs and Egg Products**. January, 2009. Disponível em: <<http://www.foodsafety.govt.nz/industry/sectors/poultry-eggs/eggs/food-standards-code-requirements.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

OLIVEIRA, D. L.; NASCIMENTO, J. W. B.; CAMERINI, N. L.; SILVA, R. C.; FURTADO, D. A.; ARAUJO, T. G. P. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, n.11, p.1186–1191, 2014.

ROBERTS, J.R., Factors affecting egg internal quality and eggshell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science*, v. 41, p. 161-177, 2004.

RODRIGUEZ-NAVARRO, A., O. Kalin, Y. Nys, and J. M. Garcia-Ruiz. Influence of the microstructure and crystallographic texture on the fracture strength of hen's eggshells. *Poultry Science*, v. 43, p.395–403, 2002.

SAIF, Y. M. Diseases of poultry. 11 ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. 1231 p.

SAMLI, H.E.; SENKOYLU, N.; OZDUVEN, M.L. Effects of Storage Time on Egg Quality of Laying Hens Fed on the Diets with Various By-Product Oils from the Oilseed Extraction Refinery. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.5, n.2, p.406-409, 2006.

SANTOS, F.F.; GOUVEA, R.; SANTOS, L.M.M.; BORGES, A.; FREITAS, M.Q.; PEREIRA, V.L.A. Consumer preference for chicken egg type: free-range, commercial or omega-3 enriched. In: 24o World's Poultry Congress, 2012, Salvador. *World's Poultry Science Journal*, v. 68, p. 170-172, 2012.

SCOTT, T.A.; SILVERSIDES, F.G. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*, v.79, n.12, p.1725–1729, 2000.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009. Cap. 3.8, 1.104p.

SOLOMON, S.E. **Egg & Eggshell quality**. Aylesbury:Wolfe Publishing, 1997, 149p.

SRIKANTIA, S.G. **The Use of Biological Value of a Protein In Evaluating Its Quality For Human Requirements**. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. Rome, 5 to 17 October 1981. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/MEETING/004/M2835E/M2835E00.HTM>>. Acesso em: 30 out. 2014.

TOGASHI, C.K.; KAKIMOTO, S.K.; SOARES, N.M. Avaliação dos danos nas cascas de ovos da postura ao processamento. **Avicultura Industrial**, n.05, p.41-4, 2009.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual**. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso em: 21 jan. 2015.

USDA - UNITED STATES DEPARTMNT OF AGRICULTURE. **Egg-grading manual Agricultural Handbook**. Washington: Department of Agriculture. 2000. 56p. (Agricultural Marketing Service, 75). Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004502>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

VAN IMMERSEEL, F.; NYS, Y.; BAIN, M. Improving the safety and quality of eggs and egg products. **Volume 2: Egg safety and nutritional quality**. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011. 408 p.

VÉRAS, A. L.; VELLOSO, C. B. O.; MATIOTTI, T. G.; FARIA, T. C. Avaliação da qualidade interna de ovos armazenados em dois ambientes em diferentes tempos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Supl. 5, p. 55, 2000.

WHO/FAO. **Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens**. 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4392e/y4392e00.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

3.2 ARTIGO 2 - Eggshell Apex Abnormalities in a Free-range Hen Farm with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de Janeiro State, Brazil

Artigo publicado no periódico Revista Brasileira de Ciência Avícola (ISSN 1516-635X), considerado como B1 no Qualis/CAPES.

SANTOS, F. F.; BRANDÃO, M. D. M.; SILVA, C. C.; MACHADO, L. S.; SOARES, M. V.; BARRETO, M. L.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Eggshell Apex Abnormalities in a Free-range Hen Farm with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.16, n.2, p. 101-104, 2014.

**Eggshell Apex Abnormalities in Free-range Hen Farm with  
*Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de  
Janeiro State - Brazil**

Felipe Faccini dos Santos<sup>1\*</sup>, Mariza Dinah Manes Brandão<sup>1</sup>, Cátia Cardoso da Silva<sup>1</sup>, Leandro dos Santos Machado<sup>1</sup>, Mariane Verinaud Soares<sup>2</sup>, Maria Lúcia Barreto<sup>3</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>1,2</sup>, Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal; <sup>2</sup> Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense; <sup>3</sup> Núcleo de Animais de Laboratório, Universidade Federal Fluminense.

---

<sup>2</sup> Correspondence to:

Felipe Faccini dos Santos

Rua Dr. Mário Viana, 369

Santa Rosa

24241-000 – Niterói, RJ, Brasil

Tel.: (21) 9644-6453

E-mail: felipefaccini@vm.uff.br

## ABSTRACT

A farm of 3,000 free-range hens, ranging from 24 to 65 weeks of age was investigated. These hens were separated in small flocks of 400 to 700 birds, which showed a decline in egg production of 10 up to 23%. Twenty serum samples were collected during the period of drop in production, and three weeks later for investigation of *Mycoplasma synoviae* (MS) and Infectious Bronchitis Virus (IBV) antibodies by ELISA. At the time of the second collection, egg production had already come to normal, however, it became evident the presence of 10.23% of eggs with abnormalities limited to the apex of the shell. There was a significant difference between eggshell strength of normal and eggs with eggshell apex abnormalities, but not for the other egg quality parameters. ELISA tests have showed MS and IBV titers increase in the period studied. MS infection was confirmed by culturing and PCR from tracheal swabs. Further studies with larger sampling to ascertain the occurrence of this disease in intensive layer flocks in Brazil are under way.

KEY WORDS: eggs, mycoplasmas, egg defects, MS, IBV

## INTRODUCTION

Since 2008, a new abnormality in the shell of chicken eggs has been identified in The Netherlands (Feberwee *et al.*, 2008), followed by reports of the same abnormalities occurring in Italy (Catania *et al.*, 2010), Germany (Ranck *et al.*, 2010) and England (Strugnell *et al.*, 2011). These egg abnormalities are characterized by a roughened shell surface, shell thinning and increased translucency, which leads to an increase in the incidence of cracks and breaks. The abnormalities are confined to the top cone of the egg, up to approximately 2 cm from the apex and almost always have a very clear demarcation zone. For this reason it was called eggshell apex abnormalities (EAA). These abnormalities were related to the infection by

*Mycoplasma synoviae* (MS). A MS strain originated from the oviduct of hens producing eggs with EAA was isolated and yielded the same abnormalities after experimental infection (Feberwee *et al.*, 2009a). It was also shown that antibiotic treatment and vaccination against MS is able to reduce EAA incidence ((Feberwee *et al.*, 2009a; Feberwee *et al.*, 2009b; Catania *et al.*, 2010). Nevertheless, even with these very distinctive characteristics, EAA may not necessarily be pathognomonic for any pathogen (Strugnell *et al.*, 2011). This case report describes the occurrence of eggs with EAA in a free-range hen farm positive to MS and Infectious Bronchitis virus (IBV) in Brazil.

## **MATERIAL AND METHODS**

A farm of 3,000 free-range hens, ranging from 24 to 65 weeks of age was investigated. These hens were separated in small flocks of 400 to 700 birds. No vaccination program was being done to that moment. The affected flocks showed 10 up to 23% drop in production.

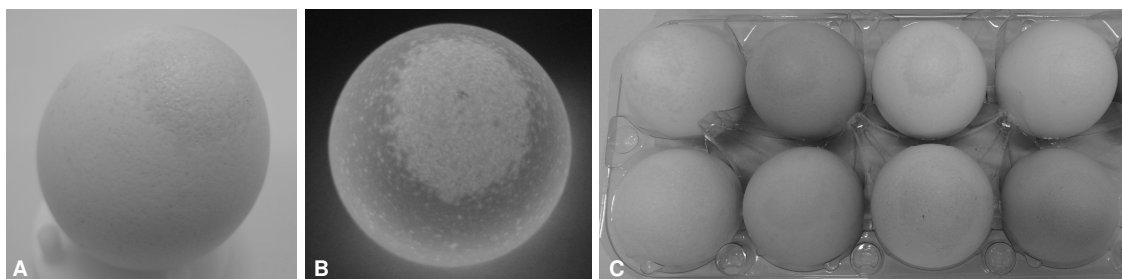
After observation of the eggs produced by these flocks, we detected abnormalities compatible with those previously reported by Feberwee *et al.* (2009a). A total of 718 eggs were analyzed for quantification of abnormal eggs laid. Of these, 46 eggs with EAA and other 60 normal were investigated for quality tests with approximate weights. The 46 eggs cases and 60 controls were analyzed for the parameters of Haugh units (HU), yolk color, egg weight, eggshell strength and eggshell thickness, measured at the bottom, side and apex.

Twenty blood samples were collected at the moment of higher drop in production and five weeks later for investigation of antibodies against MS, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and IBV by ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA). It were collected 10 tracheal swabs at the farm and five hens taken to the Laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, where they were submitted to euthanasia by atlanto-occipital dis-articulation followed by necropsy, for collection of the

trachea and oviduct (magnum and shell gland) with the help of swabs. Mycoplasma culturing was performed using modified agar and broth Frey Medium, incubated at 37°C under microaerophilic conditions and examined for growth for up to 21 days. PCR was done with procedures described by Lauerman (1998) for MS using specific primers which amplify a 207 bp amplicon and by Nascimento *et al.* (2005) for MG using specific primers which amplify a 481 bp amplicon. DNA extraction was performed using the phenol/chloroform method (Sambrook *et al.*, 1989).

## RESULTS AND DISCUSSION

On the evaluation of the eggs from affected flocks, 7.52 % had EAA (Figure 1). Previous studies reported a variation on EAA incidence from 1.3% on intensive layer farm in Italy (Catania *et al.*, 2010) to 25% on layers housed on the floor in The Netherlands (Feberwee *et al.*, 2009a).



**Figure 1-** A. Egg with rough and thin shell limited to the apex. B. Candling of the egg in Figure 1A, noting an increase on translucency at the apex of the shell. C. Eggs with alterations compatible to eggshell apex abnormalities (EAA).

It were not found significant differences between the quality of normal and abnormal eggs for the parameters of egg weight, Haugh units, yolk color and eggshell thickness. Regarding eggshell strength, it was observed a significant difference ( $P < 0.0001$ ) between normal eggs ( $39.67 \pm 7.3N$ ) and abnormal eggs ( $33.96 \pm 7.3N$ ) (Table 1). Ferberwee *et al.* (2009a) compared the eggshell strength and Haugh units of eggs from farms with and without the abnormalities and also found differences in eggshell strength but not in Haugh units.



**Table 1** - Means ( $\pm$  Standard Deviation) of the results obtained from quality tests of normal and eggs with Eggshell Apex Abnormalities (EAA) collected in a free-range hen farm in Rio de Janeiro – Brazil

Egg group	EW	AH (mm)	UH	YCL	Str (N)	Eggshell Thickness		
						Apex	Side	Bottom
Normal	62.68 (5.0)a	6.25 (1.3)a	76.67 (10.2)a	12.15 (1.2)a	39.67 (7.3)a	0.37 (0.04)a	0.37 (0.03)a	0.35 (0.03)a
EAA	63.89 (4.9)a	6.09 (1.2)a	75.43 (8.3)a	12.22 (0.9)a	33.96 (7.3)b	0.36 (0.04)a	0.37 (0.03)a	0.34 (0.03)a

EW= Egg Weight, AH= Albumen Height; UH= Haugh units; YCL= Yolk color; Str= Eggshell strength; N= Newton unit. Means with different letters within the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ; two-tailed unpaired t test).

By ELISA, the hens probably experienced an acute infection of both MS and IBV. It was observed an increase in the titers from the first to the second analysis. No serologic reaction to MG was found in the sera collected. At the moment of the second sampling the egg production was normalized, however, the frequency of abnormal eggs increased to 10.23%. After experimental infections, Feberwee *et al.* (2009a) concluded that hens infected with MS and IBV produced more eggs with EAA than birds infected only with MS.

MS was isolated from 33% (5/15) tracheal samples and not from the reproductive tract samples, but by PCR, MS was detected in 73% (11/15) of tracheal samples and 80% (4/5) of reproductive tract samples. None of samples were positive to MG, confirming that hens were infected just with MS.

The observation of abnormal eggs in free-range hen flocks affected by MS and IBV, confirmed by PCR, culturing and serology with decrease in eggshell strength, suggests the presence of EAA in Brazil. Further studies with larger sampling to ascertain the occurrence of this disease in intensive layer flocks in Brazil are under way.

## REFERENCES

- Buim MR, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2009;29(7):552-556.

Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RAJ. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Diseases 2010; 54:961-964.

Feberwee A, Morrow CJ, Ghorashi SA, Noormohammadi AH, Landman WJM. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D 1466. Avian Pathology 2009b; 38(5):333-340.

Feberwee A, Wit JJ, Landman WJM. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. Avian Pathology 2009a; 38(1):77-85.

Lauerman LH. Mycoplasma PCR Assays: Nucleic Acid Amplifications Assays for diagnosis of animal diseases. Department of Agriculture and Industries, Alabama. 1998. 150p.

Nascimento ER, Nascimento MGF, Vasconcelos MP, Barreto ML, Almeida JF, Campos CAM, Pereira VLA. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra. Acta Scientiae Veterinariae 2005; 33(3):297-301.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring Harbor (NY): Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Strugnell BW, McMullin P, Wood AM, Nicholas RAJ, Ayling R, Irvine RM. Unusual eggshell defects in a free-range layer flock in Great Britain. Veterinary Record 2011; 169:237-238.

3.3 ARTIGO 3 – Levantamento da micoplasmose em poedeiras e *Mycoplasma synoviae* como fator de risco na qualidade de ovos comerciais no sudeste do Brasil.

Artigo a ser enviado para o periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ISSN 0102-0935), classificado como A2 no Qualis/CAPES.

## **Micoplasmose em poedeiras e *Mycoplasma synoviae* como fator de risco na qualidade de ovos comerciais no sudeste do Brasil**

[Mycoplasmosis on commercial layer hens and *Mycoplasma synoviae* as a risk factor to quality of table eggs in the Southern region of Brazil]

F.F. Santos<sup>1\*</sup>, M.D.M. Brandão<sup>1</sup>, L.S. Machado<sup>1</sup>, D. S. José<sup>2</sup>, F. C. C. Aguiar<sup>2</sup>, N.M. Soares<sup>3</sup>,  
E.R. Nascimento<sup>2</sup>, V.L.A. Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduação em Medicina Veterinária – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ

<sup>2</sup>Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense - Niterói, RJ

<sup>3</sup>Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos – Instituto Biológico – Bastos, SP

\*E-mail: felipefaccini@vm.uff.br

### **Resumo**

O objetivo do estudo foi realizar o levantamento da micoplasmose em poedeiras comerciais a região sudeste do Brasil, por PCR e ELISA, e relacionar essa infecção à qualidade de ovos comerciais. Em todas as granjas estudadas houve a detecção de MS pela PCR e elevada prevalência nos lotes estudados, com 93,3% (14/15) de positividade. Na análise individual, 50,7% das galinhas foram positivas para MS (38/75). À PCR, 1,3% de positividade (1/75) e ao isolamento MG foi encontrado em 10,7% (8/75) das galinhas e 36,4% (4/11) das granjas. Dos oito isolados de MG, duas foram identificadas como cepas de campo e seis como cepas vacinais. Ao analisar os resultados de prevalência de Anormalidades no Ápice da Casca (EAA) em ovos comerciais, observou-se uma média global de 0,80% dos ovos com a anormalidade, variando de 0,17% a 2,48%. Ao realizar as comparações entre as médias dos parâmetros de qualidade de todos os ovos normais e aqueles com EAA estudados, houve diferença significativa em quase todos os parâmetros, com exceção da cor da gema. Dentre os parâmetros de qualidade estudados, aquele que mais sofreu influência da EAA foi a força da casca, que teve uma redução média de 23,1%. Foi possível determinar a alta ocorrência de MS pela PCR e pelo ELISA nos plantéis de poedeiras comerciais, assim como detectar MG pelo isolamento e diferenciar as cepas vacinais e daquelas de campo. A ocorrência de MS e a detecção de ovos com EAA nos plantéis de postura comercial na região sudeste do Brasil, sugerem a ocorrência disseminada desta infecção e da lesão nos ovos de plantéis comerciais

no sudeste do Brasil, região de maior volume de produção de ovos. Ficou demonstrado que a EAA afeta não só o ápice da casca do ovo, mas também os demais parâmetros de qualidade externa e de qualidade interna.

Palavras-chave: anormalidades no ápice da casca, EAA, *Mycoplasma gallisepticum*, prevalência

### **Abstract**

The aim of the study was to survey the mycoplasmosis in commercial layers in the southeastern of Brazil, by PCR and ELISA, and relate this infection to the quality of commercial eggs. In all studied farms MS was detected by PCR and high prevalence was found in the flocks studied, with 93.3% (14/15) of positivity. By individual analysis, 50.7% of the chickens were positive for MS (38/75). PCR for MG yielded 1.3% positivity (1/75), while by isolation MG was found in 10.7% (8/75) of the chickens and 36.4% (4/11) of the farms. Regarding the eight MG isolates, two were identified as vaccine strains and two as field strains. When analyzing the results of prevalence of Eggshell Apex Abnormalities (EAA) in commercial eggs, there was an overall prevalence of 0.80% of the eggs with the abnormality, ranging from 0.17% to 2.48%. Comparisons between the averages of the quality parameters of all normal eggs and those with EAA studied showed significant differences in almost all parameters, except for the yolk color. Eggshell strength was the most influenced quality parameter by EAA, which had an average reduction of 23.1% on affected eggs. It was possible to determine the high incidence of MS by PCR and by ELISA in laying hen flocks, as well as detect MG by isolation and differentiate vaccine and field strains. The occurrence of MS and the detection of eggs with EAA in commercial laying flocks in southeastern Brazil, suggest the widespread occurrence of this infection and alterations in eggs of the region of higher volume in egg production. Also, it was showed that EAA not only affects the egg shell apex, but also the other external and internal quality parameters.

Keywords: eggshell apex abnormalities, EAA, *Mycoplasma gallisepticum*, prevalence

### **Introdução**

O Brasil foi o sexto maior produtor mundial de ovos comerciais em 2013, com produção de 43,43 bilhões de ovos (FAO, 2015), sendo 99% desta produção destinada para consumo interno. Dentro deste cenário, a região sudeste do Brasil tem especial destaque, pois somente os estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo corresponderam por 55,38% da produção nacional de ovos comerciais em 2013. O estado do Rio de Janeiro tem produção

inexpressiva frente aos demais estados da região, no entanto, participa do circuito de aves e é um importante mercado de produtos avícolas, sendo importante em relação à epidemiologia das doenças aviárias (UBABEF, 2014).

Alterações na formação do ovo, com comprometimento do tamanho, peso, casca, albume e gema podem ser resultantes da presença de distúrbios fisiológicos ou lesão nos tecidos do sistema reprodutivo das galinhas. Entre as doenças aviárias que podem causar impacto sobre a produção e a qualidade dos ovos estão as micoplamoses, a Bronquite Infecciosa das Galinhas, a doença de Newcastle e a Síndrome da Queda de Postura (Sesti; Ito, 2009).

Em 2009 foi publicado o primeiro relato da ocorrência de lesões na casca em ovos comerciais, denominadas de anormalidades no ápice da casca ou “eggshell apex abnormalities” (EAA), relacionada à infecção por *Mycoplasma synoviae* (MS). As anormalidades foram caracterizadas por determinar uma casca áspera e fina, com aumento da translucência, resultando em rachaduras e quebras durante a coleta e processamento dos ovos. Localizavam-se na ponta fina do ovo, de até aproximadamente dois centímetros do ápice e quase sempre possuem uma região bem delimitada (Feberwee et al., 2009b).

A ocorrência das anormalidades já foi relatada em países como Holanda, Itália, Japão, África do Sul, Itália, Alemanha, Inglaterra, Chipre e Coreia (Feberwee; Landman, 2008; Catania et al., 2010; Ranck et al. 2010; Strugnell et al., 2011; Koutoulis et al., 2013; Jeon et al., 2014). No Brasil foi descrita a ocorrência de EAA em um plantel de aves caipiras no estado do Rio de Janeiro (Santos et al., 2014). A principal causa das perdas econômicas devido à EAA se deve à fragilidade da casca e consequente aumento nas quebras, com a perda do produto. É importante frisar que além das perdas econômicas, as trincas e quebras na casca favorecem contaminação do produto por microrganismos deteriorantes e patogênicos.

A real prevalência da micoplasmose aviária por MS nas criações avícolas, bem como seus efeitos econômicos, ainda são pouco conhecidos, devido à dificuldade de diagnóstico e na reprodução da doença, aliada a variação de virulência entre as diferentes cepas de MS (Nascimento et al., 2005b). Consequentemente, o controle e a erradicação de MS têm sido negligenciados, favorecendo sua disseminação, inclusive nos lotes das criações de aves alternativas (Santos et al., 2014). Desde os anos 80 e, em 1990 a prevalência de MS em frangos aumentou, chegando a ultrapassar a de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) em lotes de reprodutoras (Balén; Fiorentin, 1990). Profissionais em avicultura e produtores tendem a aceitar o comentário de que a grande maioria dos sistemas de produção da moderna avicultura

industrial é controlada contra MG e muitos são positivos para MS (Sesti, 2001; Buim et al., 2009).

O objetivo do estudo foi realizar o levantamento da micoplasmose em poedeiras comerciais na região sudeste do Brasil e relacionar essa infecção à qualidade de ovos comerciais.

### **Material e Métodos**

Foi realizado de um estudo observacional transversal para o levantamento epidemiológico das micoplasmoses aviárias em galinhas de postura comercial na região sudeste do Brasil e um estudo de caso-controle para analisar os efeitos das EAA na qualidade de ovos comerciais dessas criações pela comparação de ovos normais e afetados, provenientes de um mesmo lote.

O estudo transversal foi realizado pela análise de 14 lotes de poedeiras comerciais, sendo cinco lotes em São Paulo, quatro lotes em Minas Gerais, quatro lotes no Espírito Santo e dois lotes no Rio de Janeiro. De cada lote, foram coletadas 15 amostras de sangue e obtenção de soro para sorologia e cinco aves submetidas à necropsia para coleta de amostras com finalidade de detectar micoplasmas pela PCR e isolamento. As granjas e lotes de origem das amostras foram identificadas com códigos para garantir o sigilo das informações. Todos os lotes estudados faziam vacinação regular durante a recria contra MG com uma a duas doses de vacinas vivas e contra o vírus da Bronquite Infeciosa das Galinhas (IBV) com três a cinco doses de vacinas vivas e uma inativada. Em nenhuma granja era adotada a vacinação contra MS.

Para a obtenção do soro, as aves foram sangradas por punção da veia braquial (asa) e durante a necropsia foram coletados fragmento de ovário, suabes de traqueia e glândula da casca. Os suabes e fragmento de ovário foram acondicionados em criotubos contendo meio líquido de Frey modificado com 50% de soro suíno e 50% de soro equino (Frey et al., 1968), sob refrigeração, para o isolamento e a PCR. Todos os procedimentos de coleta utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense sob número 199, do dia 17 de maio de 2012.

As amostras de soro foram analisadas pelo ELISA para MS, MG e IBV pela utilização de kits comerciais (IDEXX, Maine, USA), conforme as instruções do fabricante.

Para o isolamento, 0,2 mL de cada amostra foram inoculadas em 1,8 mL de caldo de meio Frey e 0,2 mL semeado por espalhamento em meio Frey sólido, sendo o restante acondicionado em glicerina a 50% e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso na PCR. Todos os tubos e as

placas foram incubados à 37°C, em ambiente de microaerofilia. A verificação de crescimento foi indicada pela alteração da cor vermelha para amarelo no caldo e pela verificação do crescimento de colônias típicas de micoplasma nas placas, em forma de ovo frito, visualizadas em microscópio estereoscópico com aumento de 100X por um prazo de até 21 dias de incubação (Whitford et al., 1994).

Para o diagnóstico pela PCR, foi extraído o DNA de 0,5mL de cada amostra ou cultivo pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). A PCR para MS foi realizada de acordo com a metodologia de Lauerman (1998) e para MG de acordo com a metodologia de Nascimento et al. (2005a).

A prevalência de EAA foi determinada pela observação dos ovos nos entrepostos de cada granja. Os ovos considerados do tipo EAA, ou seja, com alterações no ápice da casca, apresentaram superfície rugosa, com casca fina e maior translucência no ápice. A contabilização ocorreu na sala de classificação, após a etapa de lavagem, durante a ovoscopia, e parte destes foi acondicionada em cartelas de papelão para as análises de qualidade. Foram coletados 30 ovos com EAA (caso) e outros 30 do tipo Normal (controle), oriundos do mesmo lote, com peso similar. Os parâmetros de qualidade analisados foram: peso do ovo (g); resistência da casca (N); altura do albume (mm); unidades Haugh (UH); espessura da casca medida em três pontos, ápice, meio e fundo (mm) e porcentagem de casca (%). Todas as análises foram realizadas e registradas pelo equipamento Digital Egg Tester 6000 (Nabel). Os valores de UH foram obtidos pela medição da altura do albume no ponto médio entre a gema e o limite do albume denso e do peso, utilizando a fórmula simplificada,  $UH = 100 \times \text{Log}(H - 1.7W^{0.37} + 7.57)$  (Eisen et al., 1962).

Comparações entre duas médias para os parâmetros de qualidade entre os ovos EAA e normais foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Foi utilizado o programa GraphPad InStat® versão 3.10 (GraphPad Software, La Jolla, CA) nas análises.

### **Resultados e Discussão**

Em todas as granjas estudadas houve a detecção de MS pela PCR e elevada prevalência nos lotes estudados, com 92,9% (13/14) de positividade. Na análise individual, 48,6% das galinhas foram positivas para MS (34/70). Houve grande importância da traqueia como material de diagnóstico da infecção por MS, 47,1% dos suabes de traqueia foram positivos e 10,0% dos fragmentos de ovários. Nenhum suabe de glândula da casca foi positivo (Tab. 1). Mesmo o único lote que foi negativo para MS pela PCR, G10-L1, apresentou média de título para MS ao ELISA três vezes maior que o segundo lote da mesma granja, G10-L2



(Tab. 2), que teve todas as galinhas analisadas positivas para MS pela PCR, podendo então, o lote G10-L1 ser considerado infectado por MS. Destaca-se que em nenhuma granja foi feita vacinação contra MS. Apesar da alta prevalência de MS detectada pela PCR, não houve nenhum isolamento da bactéria a partir destas amostras.

Tabela 1. Resultados por método de detecção de micoplasmas em poedeiras comerciais no sudeste do Brasil divididos por local de coleta do material na galinha e total de galinhas positivas por lote.

Estado	Origem da amostra	Isolamento de micoplasmas				Isolamento de MG				PCR - MS				PCR - MG			
		TQ	OV	GC	G+	TQ	OV	GC	G+	TQ	OV	GC	G+	TQ	OV	GC	G+
São Paulo	G1 - L1	1	0	0	1	1	0	0	1	4	0	0	4	1	0	0	1
	G2 - L1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	G3 - L1	2	0	0	2	2	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0
	G4 - L1	3	3	2	4	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0
	G4 - L2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0
Rio de Janeiro	G5 - L1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
	G6 - L1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	4	0	0	0	0
Minas Gerais	G7 - L1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	4	0	0	0	0
	G7 - L2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0
	G8 - L1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Espírito Santo	G9 - L1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	0	0
	G9 - L2	1	0	2	2	1	0	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0
	G10 - L1	1	2	2	3	1	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	G10 - L2	0	1	0	1	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0
	G10 - L3*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>9</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>33</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Porcentagem do total (%)</b>		<b>12,9</b>	<b>8,6</b>	<b>8,6</b>	<b>20,0</b>	<b>7,1</b>	<b>2,9</b>	<b>5,7</b>	<b>11,4</b>	<b>47,1</b>	<b>10,0</b>	<b>0,0</b>	<b>48,6</b>	<b>1,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,4</b>

\* Dados não coletados.

Legenda: TQ=traqueia; OV=ovário; GC=glândula da casca; G+=número de galinhas positivas no teste.

Entre os anos de 2001 e 2004 a prevalência de MS nos estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, foi estimada em 33,3% (11/33) das granjas, 32,8% (23/70) dos lotes e 20,8% (218/1046) das galinhas (Buim et al., 2009). Mais tarde, outro levantamento realizado entre os anos de 2012 e 2013, no estado de Minas Gerais, revelou uma prevalência de 50,3% (80/159) de positividade para MS nas galinhas (Couto, 2014). O presente estudo, juntamente com os estudos anteriores permitiu identificar uma ascendência na prevalência de MS nos plantéis de

poedeiras comerciais no Brasil. Apesar da relativa baixa prevalência de ovos com EAA, a prevalência de 100% de MS nas granjas estudadas preocupa não só pela ocorrência deste defeito nos ovos, mas também por outros problemas que são inerentes ao MS e que podem causar grandes prejuízos na produção avícola.

Tabela 2. Resultados de ELISA para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma synoviae* (MS); *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e Bronquite Infecciosa das Galinhas em lotes de poedeiras comerciais no sudeste do Brasil.

Estado	Granja/ Lote	Idade das aves	Média geométrica IBV	CV (%)	Média geométrica MS	CV (%)	Média geométrica MG	CV (%)	Cepa da vacina contra MG
São Paulo	G1 - L1	33	4123	32,2	16876	23,4	10711	33,2	70
	G2 - L1	38	16842	31,2	27880	24,5	12139	35,9	70
	G3 - L1	38	4774	40	28544	29,2	6515	57,9	F
	G4 - L1	36	2007	42,6	16842	25,9	12251	30,8	F
	G4 - L2	40	10041	29,7	14345	34,2	1326	38,6	F
Rio de Janeiro	G5 - L1	40	4030	70	8819	40,6	3392	34	F
	G6 - L1	73	3648	39	13341	28,1	7102	26,6	F
Minas Gerais	G7 - L1	75	3479	35,8	15914	19,5	9130	30,3	F
	G7 - L2	45	2327	67,1	12910	32	13821	28,2	F
	G8 - L1	50	898	64	14896	27,7	11018	49,3	F
Espírito Santo	G9 - L1	53	5112	41	3116	80	95	194,2	F
	G9 - L2	44	1399	67,6	5941	66,6	501	49,3	F
	G10 - L1	24	3895	49,7	3435	57,7	1779	62,7	F
	G10 - L2	34	87	133,2	1098	80,7	79	144,6	F
	G10 - L3*	-	-	-	-	-	-	-	-

Por outro lado, os resultados referentes à infecção pelo MG foram bem inferiores. À PCR, somente 1,4% de positividade (1/70), no entanto, foi isolado MG a partir de 11,4% (8/70) das galinhas e de 40,0% (4/10) das granjas. A baixa positividade pela PCR pode ter ocorrido devido a um número baixo de organismos na amostra, que dificulta a detecção pela técnica. Pela análise da sequência genética do espaçador intergene 16S-23S dos isolados, verificou-se que somente duas destas se tratavam de cepas selvagens (Santos et al., 2015, dados não publicados). Buim et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes pela PCR para indivíduos, com 1,1% (12/1046), e para granjas, com 18,2% (6/33), no entanto, Couto (2014) obteve resultados superiores, com 48,4% (77/159) de positividade para MG em indivíduos. Como os resultados da PCR (Tab. 1) e sorologia (Tab. 2) para MG foram sempre inferiores aos de MS e considerando que os lotes são vacinados, admite-se que estes lotes tenham uma infecção por MG controlada.

Ao analisar os resultados de prevalência de EAA em ovos comerciais, observou-se uma média global de 0,80% dos ovos com a anormalidade, que dependendo do lote analisado variou entre 0,17% a 2,48% (Tab. 3). As EAA foram encontradas em ovos brancos e vermelhos, não tendo havido influência da cor sobre a prevalência das anormalidades nos ovos. Este número provavelmente está subestimado, pois não foi possível contabilizar a incidência das anormalidades em ovos quebrados no trajeto granja-entrepasto e aqueles retirados antes da ovoscopia por quebras e trincas evidentes. Como a EAA é justamente um fator que predispõe ao aumento de quebras e trincas, a ocorrência nestes ovos pode ser muito mais elevada que naqueles íntegros que passam pela ovoscopia. O aumento da incidência de trincas em lotes produzindo ovos com EAA quantificado por alguns pesquisadores. Koutoulis et al. (2013) verificaram uma queda na porcentagem de ovos trincados de 3,7% para 1,98% após tratamento com antibióticos e Jeon et al. (2014) verificaram um aumento de 2,6% para 8,3% após instalação da doença.

Tabela 3. Prevalência de Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) em granjas comerciais no sudeste do Brasil.

Estado	Granja/Lote	Cor da casca <sup>1</sup>	Número de ovos analisados	Número de ovos com EAA	Prevalência de EAA
São Paulo	G1 - L1	B	43200	167	0,39%
	G2 - L1	V	8280	102	1,23%
	G3 - L1	B	16200	27	0,17%
	G4 - L1	B	35890	889	2,48%
	G4 - L2	V	25200	191	0,76%
Rio de Janeiro	G5 - L1	B	6690	64	0,96%
	G6 - L1	B	6180	16	0,26%
Minas Gerais	G7 - L1*	V	-	-	-
	G7 - L2*	B	-	-	-
	G8 - L1	B	105000	286	0,27%
Espírito Santo	G9 - L1	B	8100	102	1,26%
	G9 - L2	V	26640	420	1,58%
	G10 - L1	B	19500	140	0,72%
	G10 - L2	B	10165	94	0,92%
	G10 - L3*	B	6322	37	0,59%
<b>MÉDIA</b>			<b>317367</b>	<b>2535</b>	<b>0,80%</b>

\*Dados não coletados.

Legenda: B=casca branca; V=casca vermelha.

Feberwee et al. (2009b) no primeiro relato da EAA, descreveram a possibilidade da ocorrência de anormalidades em até 25% dos ovos, no entanto, estudos posteriores revelaram

valores de prevalência mais baixos. Aquela encontrada no presente trabalho foi similar à relatada por Catania et al. (2010), que obtiveram em dois lotes de 0,1% e 1,3% a 1,8% dos ovos com a doença. Estes autores ainda estimaram perdas econômicas por ovos com em média três gramas mais leves. Strugnell et al. (2011) estimaram uma prevalência de 5% dos ovos com EAA, um aumento de 10% nas perdas por quebras e ovos rejeitados e queda de 5% na produção de ovos. Jeon et al. (2014) observaram uma queda de 7% na produção de ovos por aves contaminadas por MS e Santos et al. (2014) estimaram uma queda de 10% a 23% em um lote produzindo ovos com EAA e coinfeção por MS e IBV.

Na comparação dos parâmetros de qualidade obtidos dos ovos normais e com EAA houve variação daqueles que foram diferentes estatisticamente, dependendo do lote analisado. Dos 15 lotes de ovos analisados, destacam-se as diferenças na força da casca que diferiu em 13 deles; na espessura do fundo da casca em oito deles; na média de espessura da casca em sete deles; e na porcentagem de casca em seis dos lotes. Apesar da característica dos ovos com EAA ser de uma região bem delimitada e de casca fina no ápice, houve um maior número de lotes com diferenças entre ovos normais e com EAA quando analisada a região do fundo da casca que propriamente o ápice (Tab. 4). Uma possível explicação é que os ovos afetados, além de mais finos, possuem o ápice rugoso, que pode aumentar artificialmente a espessura pela irregularidade da casca.

Ao realizar as comparações entre as médias de todos os ovos normais e aqueles com EAA estudados, houve diferença significativa em quase todos os parâmetros, com exceção da cor da gema. Desta forma, apesar de a EAA estar localizada em um ponto específico da casca do ovo, influenciou tanto na qualidade externa, quanto interna do ovo. Houve também diferença estatística para o peso dos ovos. A coleta foi direcionada para obtenção de ovos com pesos similares, apesar disto houve diferença significativa entre os ovos normais e com EAA, ainda assim, provavelmente a diferença de 1,4% entre os pesos não influenciou nos demais parâmetros analisados (Tab. 4).

Dentre os parâmetros de qualidade estudados, aquele que mais sofreu influência da EAA foi a força da casca, que teve uma redução média de 23,1% (Tab. 4). Destaca-se que este resultado foi obtido pela comparação entre ovos com EAA e ovos normais, de lotes com galinhas que produziram ovos com EAA, por isso, as diferenças poderiam ser maiores se comparados com ovos normais de lotes não produtores de ovos com EAA, como evidenciado por Feberwee et al. (2009b). Uma redução similar na força da casca pela presença de EAA foi encontrada por Jeon et al. (2014), com uma redução de 22,0% quando comparado a ovos normais de lotes afetados e de 27,1% quando comparado a ovos de lotes não afetados.

Brandão et al. (2014) verificaram uma redução de 16,6% no verão e de 18,8% no inverno quando analisaram ovos com e sem EAA do mesmo lote e Santos et al. (2014) uma redução na resistência de 14,4%.

Tabela 4. Valores médios obtidos para os parâmetros de qualidade de ovos normais e com Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) e diferença percentual entre as médias.

Parâmetro de qualidade	Tipo do ovo		Diferença percentual
	Normal	EAA	
Peso do ovo (g)	61,20b	62,05a	1,4%
Altura do albume (mm)	6,47a	5,96b	-7,8%
Unidades Haugh	78,65a	74,67b	-5,1%
Cor da gema	7,10a	6,99a	-1,5%
Força de resistência da casa (N)	38,56a	29,64b	-23,1%
Peso da casca (g)	5,76a	5,62b	-2,5%
Percentagem de casca	9,4%a	9,1%b	-3,9%
Espessura do ápice (mm)	37,61a	36,45b	-3,1%
Espessura da lateral (mm)	38,62a	37,44b	-3,0%
Espessura do fundo (mm)	37,70a	35,95b	-4,6%
Médias das espessuras (mm)	37,98a	36,62b	-3,6%

a,b: Médias com letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ( $p < 0.05$ ; teste de Mann-Whitney).

Segundo o estudo de Feberwee et al. (2009b), a presença de EAA não afetou a medida de UH, assim como da altura do albume, apesar das diferenças, talvez pelo pequeno número de amostras analisadas. No presente trabalho a diferença foi significativa para este parâmetro, com redução de 5,1% para UH e de 7,8% na altura do albume de ovos com EAA em relação aos ovos normais (Tab. 4). Brandão et al. (2014) também verificaram diferenças entre as médias de UH de ovos normais e com EAA coletados no período do inverno, mas não naqueles coletados no período do verão.

Assim como neste estudo, Jeon et al. (2014) também encontraram diferença significativa em relação à espessura média de casca, apesar de bem superior, com redução 15% contra os 3,6% verificados neste trabalho. Brandão et al. (2014) encontraram diferenças significativas para as médias de espessura do ápice da casca nos períodos do verão e inverno e para espessura da lateral e média das espessuras no inverno.

A hipótese mais aceita para a ocorrência de EAA nos ovos, corroborada pelos trabalhos de Feberwee et al. (2009b) e Jeon et al. (2014), é a de que há uma alteração na camada mamilar da casca que prejudica a calcificação do ovo. No entanto, as alterações

patológicas tanto podem ser limitadas a uma região do oviduto afetando a fisiologia de formação do ovo, causando a EAA, como podem afetar outras regiões ou mesmo a galinha, sistemicamente, determinando alterações em outras regiões da casca, nela como um todo, ou mesmo na formação do albume. Como no presente trabalho, houve alterações tanto na qualidade externa quanto na qualidade interna, provavelmente a infecção por MS afetou toda a fisiologia de formação do ovo.

### **Conclusões**

Foi possível determinar a alta ocorrência de MS pela PCR e pelo ELISA nos plantéis de poedeiras comerciais, assim como detectar MG pelo isolamento e diferenciar as cepas vacinais e daquelas de campo.

A ocorrência de MS e a detecção de ovos com EAA nos plantéis de postura comercial na região sudeste do Brasil, sugerem a infecção disseminada e presença da alteração nos ovos de plantéis comerciais no sudeste do Brasil, região de maior volume de produção de ovos.

Ficou demonstrado que a EAA afeta não só o ápice da casca do ovo, mas também os demais parâmetros de qualidade externa e de qualidade interna.

### **Referências**

BERTECHINI, A. G. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Santos. Anais... Santos: FACTA, 2003, v. 1, p. 19-26.

BRANDÃO, M. D. M.; SANTOS, F. F.; MACHADO, L. S. et al.. The effect of eggshell apex abnormalities on table egg quality during storage in 2 seasons of the year. *Poult. Sci.*, v. 93, n. 10, p. 2657-2662, 2014.

BUIM, M. R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J. et al. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 7, p. 552-556, jul. 2009.

CATANIA, S.; BILATO, D.; GOBBO, F. et al. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian dis.*, v.54, p. 961-964, 2010.

COUTO, R. M. *Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueite infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no estado de Minas Gerais*. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

EISEN, E. J.; BOHREN, B. B.; MCKEAN, H. E. The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poult. Sci.*, v. 41, p. 1461-1468, 1962.

FEBERWEE, A.; LANDMAN, W. A novel eggshell pathology induced by *Mycoplasma synoviae*. *World Poult.*, v. 24, n. 7, p. 22-23, 2008.

FEBERWEE, A.; MORROW, C. J.; GHORASHI, S. A. et al. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D 1466. *Avian Pathol.*, v. 38, n. 5, p. 333-340, out. 2009a.

FEBERWEE, A.; WIT, J. J.; LANDMAN, W. J. M. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.*, v. 38, n. 1, p. 77-85, fev. 2009b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acessado em: 21/01/2015.

FREY, M., HANSON, H.P.; ANDERSON, D.P. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, v. 29, p. 2163-2171, 1968.

JEON, E. O.; KIM, J. N.; LEE, H. R. et al. Eggshell apex abnormalities associated with *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *J. Vet. Sci.*, v. 15, n. 4, p. 579-582, 2014.

KOUTOULIS, K. C.; KEFALAS, G.; MOUTTOTOU, N. et al. Efficacy of tylosin tartrate on mycoplasma infections and Eggshell Apex Abnormalities in layer hens under field conditions. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, v. 8, n. 4, p. 246-252, 2013.

LAUERMAN, L.H. *Mycoplasma* PCR Assays: Nucleic Acid Amplifications Assays for diagnosis of animal diseases. Alabama: Department of Agriculture and Industries, 1998. 150p.

NASCIMENTO, E. R. *Mycoplasma synoviae* em Avicultura – Implicações Econômicas: Conviver ou Erradicar. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas, SP. Anais... Campinas: FACTA 2001. v. 01, p.31 - 44.

NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F.; VASCONCELOS, M. P. et al. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, n. 3, p. 297-301, 2005a.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M.G. F.; BARRETO, M. L. Avian mycoplasmosis update. *Rev. Bras. Ciênc. Aví.*, v.7, n.1, p. 1-9, 2005b.

RANCK, M. F.; SCHMIDT, V.; PHILIPP, H. C. et al. *Mycoplasma synoviae*-associated egg-pole shell defects in laying hens. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, v. 123, n. 3-4, p. 111-118, 2010.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Laboratory, 1989. 1659p.

SANTOS, F. F.; BRANDÃO, M. D. M.; SILVA, C. C. et al. Eggshell Apex Abnormalities in a Free-range Hen Farm with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de Janeiro State, Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.*, v.16, n.2, p. 101-104, 2014.

SESTI, L. A. Filosofias e conceitos de Biosseguridade e doenças com potencial de risco para a avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, SP. Anais... Campinas: FACTA, 2001, v. 1, p.47-91.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. Doença das aves. Campinas: FACTA, 2009. Cap. 3.8, 1.104p.



SRIKANTIA, S.G. The Use of Biological Value of a Protein In Evaluating Its Quality For Human Requirements. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/MEETING/004/M2835E/M2835E00.HTM>>. Acessado em: 30 out. 2014.

STRUGNELL, B.W.; McMULLIN, P.; WOOD, A. M. et al. Unusual eggshell defects in a free-range layer flock in Great Britain. *Vet. Rec.*, v. 169, p. 237-238, 2011.

UBABEF. Relatório anual 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acessado em: 21 jan. 2015.

WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. Ames: Iowa State University, 1994. 173p.

ANEXO 1 – Valores médios obtidos para os parâmetros de qualidade interna de ovos normais e com Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) e diferença percentual entre os valores.

Estado	Granja / Lote	Cor da casca	n		Peso do ovo (g)			Altura do albume (mm)			Cor da gema			Unidades Haugh		
			Normal	EAA	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%
São Paulo	G1 - L1	B	27	29	62,67a	62,80a	0,2%	6,71a	5,67b	-15,5%	6,07a	6,11a	0,7%	80,52a	72,04b	-10,5%
	G2 - L1	V	30	29	67,02a	62,25b	-7,1%	7,38a	5,93b	-19,6%	14,44a	14,08a	-2,5%	83,15a	74,45b	-10,5%
	G3 - L1	B	30	28	59,05b	62,80a	6,4%	4,41a	4,61a	4,5%	5,56a	5,29a	-4,9%	62,68a	62,85a	0,3%
	G4 - L1	B	30	30	63,09a	60,75b	-3,7%	5,97a	5,70a	-4,5%	6,79a	5,98b	-12,0%	75,02a	73,23a	-2,4%
	G4 - L2	V	29	30	59,38a	61,91a	4,3%	5,27a	4,83a	-8,3%	6,58a	7,06a	7,3%	70,45a	64,20a	-8,9%
Rio de Janeiro	G5 - L1	B	35	33	63,91a	64,71a	1,3%	6,08a	6,20a	2,1%	5,38a	5,29a	-1,7%	75,17a	76,15a	1,3%
	G6 - L1	B	10	10	64,26a	62,97a	-2,0%	7,56a	7,33a	-3,0%	5,15a	5,01a	-2,7%	85,62a	84,68a	-1,1%
Minas Gerais	G7 - L1	V	23	17	62,35a	60,45a	-3,0%	6,78a	6,16a	-9,2%	7,39a	7,36a	-0,4%	81,04a	77,15a	-4,8%
	G7 - L2	B	25	25	60,31a	62,40a	3,5%	8,24a	6,91b	-16,2%	6,74a	6,70a	-0,6%	90,55a	82,17b	-9,3%
	G8 - L1	B	30	30	61,58a	61,19a	-0,6%	7,33a	6,25b	-14,8%	6,20a	5,67b	-8,5%	84,78a	77,55b	-8,5%
Espírito Santo	G9 - L1	B	30	29	63,73a	63,78a	0,1%	6,85a	6,49a	-5,2%	6,60a	6,59a	-0,3%	81,32a	78,69a	-3,2%
	G9 - L2	V	30	28	59,14a	61,58a	4,1%	6,91a	7,04a	2,0%	11,06a	11,33a	2,5%	82,12a	82,14a	0,0%
	G10 - L1	B	26	30	58,62b	63,31a	8,0%	6,10a	5,69a	-6,7%	6,38a	6,01a	-5,8%	77,38a	72,74a	-6,0%
	G10 - L2	B	30	29	63,96a	63,41a	-0,9%	6,13a	5,50a	-10,3%	6,29a	5,98a	-5,0%	75,37a	71,16a	-5,6%
	G10 - L3	B	27	30	62,46a	63,02a	0,9%	5,62a	5,62a	0,0%	6,09a	6,22a	2,3%	72,44a	72,38a	-0,1%
<b>MÉDIA</b>			<b>412</b>	<b>407</b>	<b>61,20b</b>	<b>62,05a</b>	<b>1,4%</b>	<b>6,47a</b>	<b>5,96b</b>	<b>-7,8%</b>	<b>7,10a</b>	<b>6,99a</b>	<b>-1,5%</b>	<b>78,65a</b>	<b>74,67b</b>	<b>-5,1%</b>

a,b: Médias com letras diferentes na mesma linha, por parâmetro de qualidade, representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ; teste de Mann-Whitney).

Legenda: B=casca branca; V=casca vermelha.

ANEXO 2 – Valores médios obtidos para os valores de espessura da casca de ovos normais e com Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) e diferença percentual entre os valores.

Estado	Granja / Lote	Cor da casca	n		Espessura do Ápice (mm)			Espessura da Lateral (mm)			Espessura do Fundo (mm)			Média das Espessuras (mm)		
			Normal	EAA	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%
São Paulo	G1 - L1	B	27	29	36,15a	30,24b	-16,30%	37,89a	33,38b	-11,90%	35,11a	31,21b	-11,10%	36,38a	31,61b	-13,10%
	G2 - L1	V	30	29	37,31a	36,14a	-3,10%	39,83a	38,31a	-3,80%	38,21a	35,03b	-8,30%	38,45a	36,49b	-5,10%
	G3 - L1	B	30	28	40,47a	41,11a	1,60%	42,47a	42,00a	-1,10%	38,73a	37,39a	-3,50%	40,56a	40,17a	-1,00%
	G4 - L1	B	30	30	36,10a	34,80a	-3,60%	35,66a	35,87a	0,60%	35,14a	35,50a	1,00%	35,63a	35,39a	-0,70%
	G4 - L2	V	29	30	38,76a	36,79a	-5,10%	39,24a	38,90a	-0,90%	39,31a	36,69b	-6,70%	39,10a	37,46a	-4,20%
Rio de Janeiro	G5 - L1	B	35	33	36,69a	36,66a	-0,10%	38,86a	38,63a	-0,60%	37,17a	37,66a	1,30%	37,57a	37,65a	0,20%
	G6 - L1	B	10	10	37,10a	37,40a	0,80%	36,20a	36,20a	0,00%	36,40a	36,20a	-0,50%	36,57a	36,60a	0,10%
Minas Gerais	G7 - L1	V	23	17	39,65a	34,72b	-12,40%	41,30a	37,22b	-9,90%	38,91a	33,28b	-14,50%	39,96a	35,07b	-12,20%
	G7 - L2	B	25	25	36,48a	37,48a	2,70%	37,24a	37,36a	0,30%	37,24a	37,44a	0,50%	36,99a	37,43a	1,20%
	G8 - L1	B	30	30	35,50a	35,83a	0,90%	36,47a	37,13a	1,80%	36,67a	37,37a	1,90%	36,21a	36,78a	1,60%
Espírito Santo	G9 - L1	B	30	29	38,03a	36,30a	-4,60%	40,50a	39,00a	-3,70%	40,33a	36,37b	-9,80%	39,62a	37,22b	-6,10%
	G9 - L2	V	30	28	37,83a	35,53b	-6,10%	38,53a	35,80b	-7,10%	38,90a	36,03b	-7,40%	38,42a	35,79b	-6,90%
	G10 - L1	B	26	30	37,92a	35,97b	-5,20%	38,56a	36,30b	-5,90%	37,84a	35,67b	-5,70%	38,11a	35,98b	-5,60%
	G10 - L2	B	30	29	37,07a	37,03a	-0,10%	37,10a	36,60a	-1,30%	36,97a	35,80a	-3,20%	37,04a	36,48a	-1,50%
	G10 - L3	B	27	30	38,48a	37,00a	-3,80%	38,59a	36,20a	-6,20%	38,63a	36,13b	-6,50%	38,57a	36,44b	-5,50%
<b>MÉDIA</b>			<b>412</b>	<b>407</b>	<b>37,61a</b>	<b>36,45b</b>	<b>-3,10%</b>	<b>38,62a</b>	<b>37,44b</b>	<b>-3,00%</b>	<b>37,70a</b>	<b>35,95b</b>	<b>-4,60%</b>	<b>37,98a</b>	<b>36,62b</b>	<b>-3,60%</b>

a,b: Médias com letras diferentes na mesma linha, por parâmetro de qualidade, representam diferença significativa ( $p < 0.05$ ; teste de Mann-Whitney).

Legenda: B=casca branca; V=casca vermelha.

ANEXO 3 – Valores médios obtidos para os parâmetros de força, peso e percentagem de casca de ovos normais e com Anormalidades no Ápice da Casca de Ovos (Eggshell Apex Abnormalities - EAA) e diferença percentual entre os valores.

Estado	Granja / Lote	Cor da casca	n		Força da casca (N)			Peso da casca			Percentagem de casca		
			Normal	EAA	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%	Normal	EAA	%
São Paulo	G1 - L1	B	27	29	43,52a	21,05b	-51,60%	5,76a	5,04b	-12,5%	9,2%a	8,0%b	-12,60%
	G2 - L1	V	30	29	33,95a	21,11b	-37,80%	6,29a	5,62b	-10,6%	9,4%a	9,0%a	-3,70%
	G3 - L1	B	30	28	43,83a	37,17b	-15,20%	6,18a	6,33a	2,30%	10,5%a	10,1%b	-3,80%
	G4 - L1	B	30	30	36,40a	34,75a	-4,50%	5,67a	5,68a	0,20%	9,0%a	9,3%a	4,10%
	G4 - L2	V	29	30	41,52a	33,97b	-18,20%	6,05a	6,03a	-0,30%	10,2%a	9,7%a	-4,40%
Rio de Janeiro	G5 - L1	B	35	33	33,89a	29,36b	-13,40%	5,98a	5,97a	-0,10%	9,4%a	9,2%a	-1,30%
	G6 - L1	B	10	10	44,68a	39,33b	-12,00%	6,01a	5,88a	-2,10%	9,3%a	9,3%a	-0,10%
Minas Gerais	G7 - L1	V	23	17	36,32a	30,12a	-20,40%	6,21a	5,47b	-11,9%	10,0%a	9,0%b	-9,10%
	G7 - L2	B	25	25	35,54a	28,10b	-20,90%	5,42a	5,57a	2,70%	9,0%a	8,9%a	-0,70%
Espírito Santo	G8 - L1	B	30	30	35,31a	26,01b	-26,30%	5,43a	5,27a	-3,10%	8,8%a	8,6%a	-2,40%
	G9 - L1	B	30	29	35,42a	27,62b	-22,00%	5,81a	5,66a	-2,50%	9,8%a	9,2%b	-6,40%
	G9 - L2	V	30	28	42,54a	31,44b	-26,10%	5,60a	5,36a	-4,30%	8,8%a	8,4%a	-4,40%
	G10 - L1	B	26	30	40,07a	27,63b	-31,00%	5,43a	5,50a	1,30%	9,3%a	8,7%b	-6,20%
	G10 - L2	B	30	29	35,63a	27,24b	-23,60%	5,61a	5,60a	-0,20%	8,8%a	8,8%a	0,70%
	G10 - L3	B	27	30	38,77a	29,95b	-22,80%	5,82a	5,50a	-5,50%	9,3%a	8,7%b	-6,30%
	<b>MÉDIA</b>		<b>412</b>	<b>407</b>	<b>38,56a</b>	<b>29,64b</b>	<b>-23,1%</b>	<b>5,76a</b>	<b>5,62b</b>	<b>-2,50%</b>	<b>9,4%a</b>	<b>9,1%b</b>	<b>-3,90%</b>

a,b: Médias com letras diferentes na mesma linha, por parâmetro de qualidade, representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ; teste de Mann-Whitney).

Legenda: B=casca branca; V=casca vermelha.

3.4 ARTIGO 4 – Use of 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region sequencing for characterization and differentiation of chicken trachea and reproductive tract mycoplasma isolates.

Artigo a ser enviado para o periódico Brazilian Journal of Microbiology (Impresso) (ISSN 1517-8382), considerado como A2 no Qualis/CAPES.

**Use of 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region sequencing for  
characterization and differentiation of chicken trachea and reproductive  
tract mycoplasma isolates**

Felipe Faccini dos Santos<sup>1</sup>, Jianping Li<sup>2</sup>, Mariza Dinah Manes Brandão<sup>1</sup>,  
Leandro dos Santos Machado<sup>1</sup>, Nilce Maria Soares<sup>3</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>4</sup>,  
Mazhar I. Khan<sup>2</sup>, Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal; <sup>2</sup> Department of Pathobiology, University of Connecticut; <sup>3</sup> UDP-Bastos, Instituto Biológico; <sup>4</sup> Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense;

---

<sup>1</sup> Correspondence to:

Felipe Faccini dos Santos

Rua Dr. Mário Viana, 369

Santa Rosa

24241-000 – Niterói, RJ, Brasil

Tel.: (21) 9644-6453

E-mail: felipefaccini@vm.uff.br

## ABSTRACT

The objective of this study was to identify the species and characterize the genetic relation amongst mycoplasma isolates from commercial layer hen flocks by 16S–23S rDNA IGSR sequencing. Mycoplasma isolation was performed on commercial layer flocks of four Brazilian states, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Espírito Santo. Sampling was done in 15 flocks and each flock had five hens necropsied for trachea and shell gland swabs and ovary fragment collection, with a total of 225 samples. The 16S–23S rDNA IGSR of isolates were amplified by PCR. The consensus of each isolate obtained were compared to those available using Nucleotide BLAST® to determinate the mycoplasma species. MG sequences were compared for phylogenetic analyses. Twenty one (10.7%) isolates were obtained, 11 isolates from trachea, five from the ovary and five from shell gland. The isolates were recovered from seven different flocks of São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo states. Minas Gerais state did not yield any isolate. Pairwise analysis have shown homologies of 99% to 100% with previously characterized sequences on GenBank®. Non-pathogenic mycoplasmas were isolated from three flocks, one at São Paulo and two at Rio de Janeiro. All other 11 isolates were identified as MG, obtained from two flocks of São Paulo and two flocks of Espírito Santo. The 16S–23S rDNA IGSR sequencing have shown to be a good alternative for identification of *Mycoplasma* species isolated from field samples, giving fast and reliable results, at relatively low costs. The results were also satisfactory for SLST of MG isolates.

**KEYWORDS:** *Mycoplasma gallinaceum*, *Mycoplasma pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum*, mycoplasmas, sequencing.

## INTRODUCTION

*Mycoplasma* infections are highly prevalent amongst poultry flocks and three species are considered pathogenic, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (MM). Economic losses attributed to mycoplasmosis are due to drop in egg production and quality, poor hatchability and feed efficiency, high mortality rates and carcass condemnation rates on slaughter (Kleven, 2003; Nascimento et al., 2005; Nascimento; Pereira, 2009). These microorganisms have preference for mucous and serous membranes of the birds, causing respiratory, joint and urogenital pathologies. There are several strains of MG, MS and MM, phenotypic and genotypically different, which have diverse degrees of pathogenicity, virulence and immunogenicity (Kleven, 2003; Nascimento et al., 2005). The transmission of mycoplasmas can occur horizontally by aerosols, by

sexual contact or artificial insemination, by direct contact with contaminated birds and indirect contact through people, other animals, food, water and equipment; or vertically by egg transmission (Kleven, 2003; Nascimento; Pereira, 2009). In addition to notably pathogenic species, other 20 *Mycoplasma* species infects birds. They are regarded as nonpathogenic species; however, some cases have been reported in which these species caused diseases (Ganapathy et al., 1998; Kleven et al., 1978; Yagihashi et al., 1993; Moalic et al., 1997; Silva et al., 2014; Gomes, 2013).

Identification of *Mycoplasma* species with conventional techniques can be very laborious, demanding use of biochemical and serological tests. Ferguson et al. (2005) have described a method with high discriminatory power amongst MG isolates by sequencing four regions of the bacteria that encode surface proteins. Shortly later, Raviv et al. (2007) had similar results by sequencing the 16S-23S rDNA intergenic spacer region, using it as a single-locus sequence typing (SLST) tool for MG isolate differentiation in diagnostic cases and epizootiological studies. With the same method, Ramírez et al. (2008) found that the 16S–23S rDNA intergenic spacer regions (IGSR) of avian mycoplasmas could be used to differentiate species, since this region of the DNA had a low homology inter-species, with a maximum (90.5%) and minimum (7.9%) percent of homology. New techniques for DNA sequencing allows its use in routine tests, with relatively low costs and much faster results, making 16S–23S rDNA IGSR a good alternative for species identification and typing of mycoplasmas recovered from field samples.

The objective of this study was to identify the species and characterize the genetic relation amongst mycoplasma isolates from commercial layer hen flocks by 16S–23S rDNA IGSR sequencing.

## **MATERIAL AND METHODS**

The isolation of *Mycoplasma* was performed on commercial layer flocks of four Brazilian states, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Espírito Santo. Sampling was done in 15 flocks and each flock had five hens necropsied for trachea and shell gland swabs and ovary fragment collection, with a total of 225 samples. Swabs and fragments were processed for mycoplasma culture using modified Frey broth medium (Frey et al., 1968). Sampling was previously approved by the Ethics Committee on Use of Animals of the Universidade Federal Fluminense under registry number 199, on May 17, 2012.

DNA was extracted by phenol-chloroform method from 1mL of media that had the color changed. The 16S–23S rDNA IGSR of isolates were amplified by PCR as described by Ramírez et al. (2008), using the forward primer 5′-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3′ and the reverse primer 5′-



CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'. Sequencing was conducted in Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and was determined for each strand of DNA, using Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. The resulting chromatograms were examined and the forward sequence and reverse complimented sequences of all the isolates were compared to produce a consensus sequence using in Lasergene SeqMan (Version 7.2.1; DNASTAR, Australia).

The consensus of each isolate obtained were compared to those available using Nucleotide BLAST® to determinate the mycoplasma species. Reference samples used were from isolates obtained by Couto (2014) in Minas Gerais state and from other countries available in GenBank® with the following accession numbers: KJ019166 (UFMG 2011-1); KJ019167 (UFMG 2011-2); KJ019168 (UFMG 2011-3); KJ019169 (UFMG 2012); KJ019170 (MG 70); HQ143383 (MG F USA); JQ770172 (MG S6); KC247865 (MG 6-85); JN935873 (MG PG31); KC247863 (MG USA-R-CK60); and KC247864 (MG TS-11). IGSR isolate sequences and reference sequences were aligned by Clustal-W method, and the dendogram was constructed by the neighbour-joining method with 1000-bootstrap replicates. Phylogenetic analysis were conducted using MEGA version 6 (TAMURA et al., 2013).

## RESULTS AND DISCUSSION

From the 225 samples, 21 (10.7%) isolates were obtained, 11 isolates from trachea, five from the ovary and five from shell gland. The isolates were recovered from seven different flocks of São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo states. Minas Gerais state did not yield any isolate (Table 1).

Pairwise analysis carried out to compare nucleotide sequences allowed the species identification with homologies of 99% to 100% of previously characterized sequences on GenBank®. Non-pathogenic mycoplasmas were isolated from three flocks, one at São Paulo and two at Rio de Janeiro. Regarding Flock 2, *M. pullorum* was isolated from four hens from all sites of sampling, trachea, shell gland and ovary and *M. gallinaceum* was found in the shell gland of one bird. From Flocks 4 and 5, the only mycoplasma isolated was *M. gallinaceum*. It shows that despite of not being pathogenic, these species can easily colonize different parts of the hen. Also, it have been shown that the interaction of *M. gallinaceum* with MS can exacerbate synovitis (Yagihashi et al., 1993), and was associated to a higher prevalence of Infectious Coryza (Gomes, 2013). It was also shown that *M. pullorum* and *M. gallinaceum* can act as pathogens (Moalic et al., 1997; Silva et al., 2014), it was not yet studied the interactions of these species with MG.

All other 11 isolates were identified as MG, obtained from two flocks of São Paulo and two flocks of Espírito Santo. All the isolates from Espírito Santo flocks clustered together with UFMG2012

and the reference strain MG F. Samples isolated from Flock 3 were similar to MG S6, but also closely related to vaccine strain MG 70, which was used in the Flock. The sample isolated from Flock 1 was similar to vaccine strain MG 6/85, despite the use of MG 70 vaccine strain in this flock (Figure 1). This could be due to contamination between other flocks that uses this vaccine. Also, isolates from each state were almost always separated from one another and isolates from the same state were always together. The Figure 2 shows the nucleotide differences amongst MG isolates from Brazil, vaccine and reference strains.

The 16S-23S rDNA IGSR sequencing have shown to be a good alternative for identification of *Mycoplasma* species isolated from field samples, giving fast and reliable results, at relatively low costs. The results were also satisfactory for SLST of MG isolates.

## REFERENCES

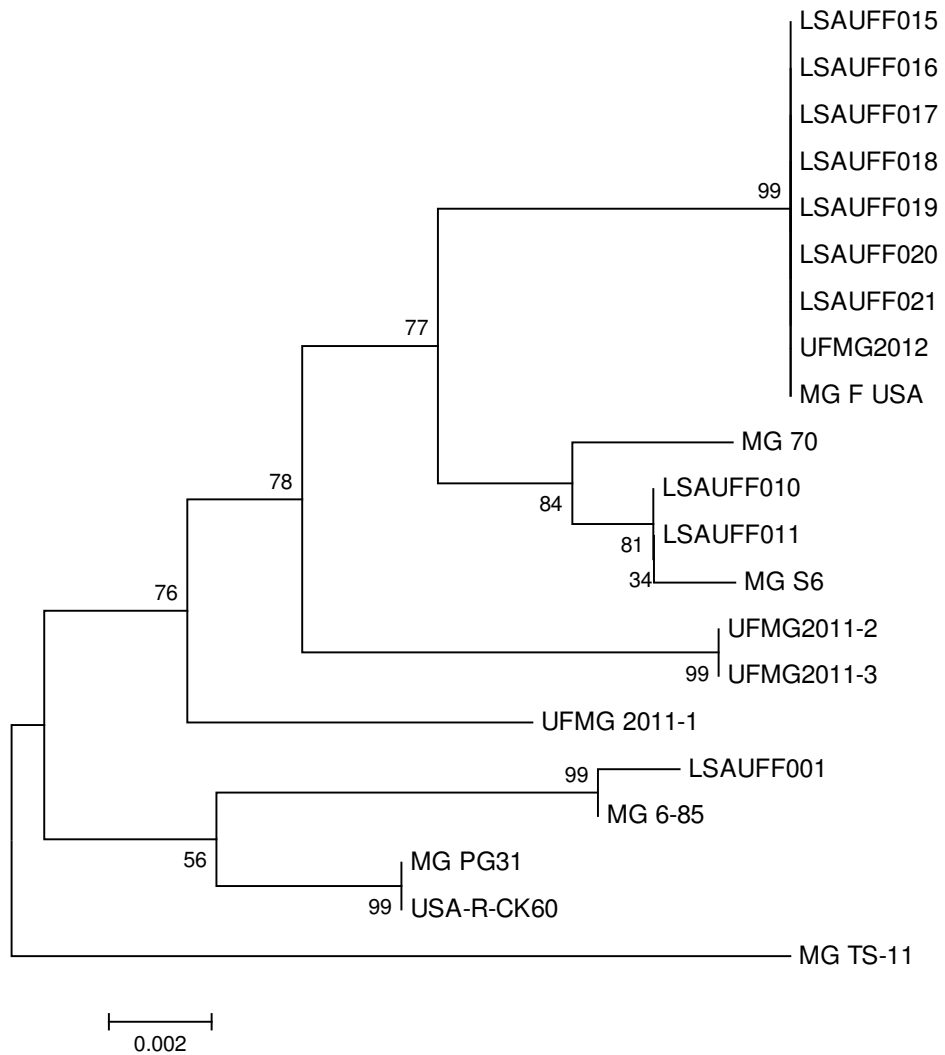
- Couto, RM. Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueite infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no estado de Minas Gerais. [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2014.
- Ferguson NM, Hepp H, Sun S, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH, García M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology* 2005; 151:1883–1893.
- Frey ML, Hanson RP, Anderson DP. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *American Journal of Veterinary Research* 1968; 29:2163–2171.
- Ganapathy K, Jones RC, Bradbury JM. Pathogenicity of in vivo-passaged *Mycoplasma imitans* in turkey poult in single infection and in dual infection with rhinotracheitis virus. *Avian Pathology* 1998; 27:80-89.
- GENBANK. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Available in: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Gomes AM. Caracterização molecular de *Mycoplasma* da avicultura industrial dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. [Tese] Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.

- Kleven SH, Eidson CS, Fletcher OJ. Airsacculitis induced in broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. *Avian Diseases* 1978, 22:707-716.
- Kleven SH. Micoplasmosis. In: Saif YM, Blarner HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 11th, p. 719-21. 2003.
- Moalic PY, Kempf I, Gesbert F, Laigret F. Identification of two pathogenic mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997, 47:171-174.
- Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML. Avian mycoplasmosis update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2005, 7(1):1-9.
- Nascimento ER, Pereira VLA. Micoplasmoses. IN: Berchieri Jr. A, Silva EN, Di Fabio J, Sesti L, Zuanaze MAF. *Doenças das aves*, Campinas : FACTA, 1104p., 2009, 485-502p.
- Ramírez AS, Naylor CJ, Pitcher DG, Bradbury JM. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology* 2008, 128:279–287.
- Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence as a Novel Tool for Epizootiological Studies. *Avian Diseases* 2007, 51(2):555-560.
- Silva CC, Brandão MDM, Nascimento ER, Almeida JF, Abreu DLC, Barreto ML, Soares MV, Machado LS, Pereira VLA. *Mycoplasma gallinarum* in laying hens with respiratory disease. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 2014, 36(4):347-350.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013, 30:2725-2729.
- Yagihashi T, Nunoya T, Otaki Y. Effects of dual infection of chickens with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallinaceum* or Infectious Bursal Disease virus on infectious synovitis. *Japan Journal of Veterinary Science* 1993, 45(4):529-532.

Table 1. Flock location where mycoplasmas were isolated, flock identification, number of the hen, site where the hen was sampled, species name and sample identification.

<b>Flock location (State)</b>	<b>Flock ID</b>	<b>Hen ID</b>	<b>Site of the hen sampled</b>	<b>Species</b>	<b>Sample ID</b>
São Paulo	Flock 1	B	Trachea	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 001
	Flock 2	B	Trachea	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 002
	Flock 2	B	Shell gland	<i>M gallinaceum</i>	LSA UFF 003
	Flock 2	B	Ovary	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 004
	Flock 2	C	Trachea	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 005
	Flock 2	D	Trachea	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 006
	Flock 2	D	Ovary	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 007
	Flock 2	E	Shell gland	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 008
	Flock 2	E	Ovary	<i>M pullorum</i>	LSA UFF 009
	Flock 3	A	Trachea	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 010
Rio de Janeiro	Flock 3	D	Trachea	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 011
	Flock 4	D	Trachea	<i>M gallinaceum</i>	LSA UFF 012
	Flock 5	A	Trachea	<i>M gallinaceum</i>	LSA UFF 013
Espírito Santo	Flock 5	B	Trachea	<i>M gallinaceum</i>	LSA UFF 014
	Flock 6	A	Shell gland	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 015
	Flock 6	A	Ovary	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 016
	Flock 6	C	Ovary	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 017
	Flock 6	E	Shell gland	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 018
	Flock 7	A	Trachea	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 019
	Flock 7	B	Trachea	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 020
	Flock 7	B	Shell gland	<i>M gallisepticum</i>	LSA UFF 021

Figure 1. Dendrogram of *M. gallisepticum* isolates from Brazil, with vaccine and reference strains, constructed by Clustal-W alignment of IGSR sequences by the neighbour-joining method with 1000-bootstrap replicates using MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net>).





## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível determinar a alta ocorrência de MS pela PCR e pelo ELISA nos plantéis de poedeiras comerciais, assim como detectar MG pelo isolamento e diferenciar as cepas vacinais daquelas de campo.

A ocorrência de MS e a detecção de ovos com EAA nos plantéis de postura comercial na região sudeste do Brasil, sugerem a disseminação desta infecção e da anormalidade nos ovos de plantéis comerciais no sudeste do Brasil, região de maior volume de produção de ovos.

Ficou demonstrado que a EAA afeta não só o ápice da casca, mas também os demais parâmetros de qualidade externa e de qualidade interna dos ovos comerciais.

O sequenciamento da região do espaçador intergênico 16S-23S rDNA se mostrou uma boa alternativa para a identificação de espécies de *Mycoplasma* isoladas de amostras de campo, com resultados rápidos e confiáveis, de custo relativamente baixo.

Os resultados foram também satisfatórios usando a região do espaçador intergênico 16S-23S rDNA como uma ferramenta para tipagem dos isolados de MG pelo sequenciamento de um único locus (single-locus sequence typing – SLST).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovóide galinha armazenados sob refrigeração. *Scientia Agrícola*, v. 58, n. 4, p. 681-85, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Análise sensorial dos alimentos e bebidas - Terminologia - NBR 12806*. São Paulo: ABNT, 1993.

BALÉM L.; SILVA E.N.; ANDREATTI FILHO, R.L. Proteção de galinhas pela cepa vacinal conn-F de *Mycoplasma gallisepticum* na forma liofilizada e como cultura fresca. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.44, n.1, p. 49-56, 1992.

BALÉM, L.O.; FIORENTIN, L. O *Mycoplasma synoviae* e seu impacto econômico sobre a avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO 1990 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas: FACTA, 1990, p. 135-140.

BERTECHINI, A. G. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. Mitos e verdades sobre o ovo e consumo. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2003, Santos, *Anais...* Santos: FACTA, 2003, v. 1, p. 19-26.

BRANDÃO, M. D. M.; SANTOS, F. F.; MACHADO, L. S.; SOARES, M. V.; OLIVEIRA, J. M.; SOARES, N. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. The effect of eggshell apex abnormalities on table egg quality during storage in 2 seasons of the year. *Poultry Science*, v. 93, n. 10, p. 2657-2662, 2014.

BRASIL. Instrução normativa nº 44, de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e certificação de núcleos e estabelecimento avícola para a Micoplasmose Aviária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). *Diário Oficial República Federativa do Brasil*, Brasília/DF, n.163, 24 de agosto. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 56.585, de 20 de Julho de 1965. Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização do ovo. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 1965.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº30.691, de 29 de março de 1952, e alterações. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 1952.



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. Aprova as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 1990.

BRASIL. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAA). [*Diário Oficial da União*], Brasília/DF, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 5, de 05 de julho de 1991. Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 1991.

BUIM, M. R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A. J. P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 7, p. 552-556, 2009.

CAMERINI, N.L. *Qualidade dos ovos de aves poedeiras comerciais submetidas a três condições ambientais em dois sistemas de criação*. Campina Grande – PB, 2012. 115f. Tese (Engenharia Agrícola)- Centro de tecnologia e recursos naturais, Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2012.

CARBÓ, C.B. *La gallina ponedora*. Madrid, Espanha: Ediciones Mundi-Prensa, 1987. 519 p.

CATANIA, S.; BILATO, D.; GOBBO, F.; GRANATO, A.; TERREGINO, C.; IOB, L.; NICHOLAS, R. A. J. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian diseases*, v.54, p. 961-964, 2010.

CE - COMUNIDADE EUROPEIA. Regulamento (CE) no 589/2008 da comissão de 23 de junho de 2008. Estabelece as regras de execução do Regulamento (CE) n.o 1234/2007 do Conselho no que respeita às normas de comercialização dos ovos. [*Jornal Oficial da União Europeia*], L 163/6, 24 de junho de 2008.

CHILE. Ministerio de Salud. Regulamento Sanitario de los Alimentos DTO. N° 977/96. *Diario Oficial*, de 13 de maio de 1997.

COGAN, T. A.; JORGENSEN, F.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; BENSON, C. E.; WOODWARD, M. J.; HUMPHREY, T. J. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology*, v. 150, p. 1063–1071, 2004.

COUTO, R. M. *Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte, 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

COUTTS, J.A.; WILSON, G.C. *Optimum egg quality: a practical approach*. Sheffield (Reino Unido): 5M Publishing. 2007.64p.

CHRISTENSEN, N. H.; YAVARI, C. A.; MCBAIN, A. J.; BRADBURY, J. M. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathology*, v. 23, n. 1, p. 127-143, 1994.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 2006; 112:253-260.

DUFOUR-GESBERT, F.; DHEILLY, A.; MAROIS, C.; KEMPF, I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Veterinary Microbiology*, v. 114, n. 1-2, p. 148-54, 2006.

EFSA, 2009. Special measures to reduce the risk for consumers through Salmonella in table eggs – e.g. cooling of table eggs (Question No EFSA-Q-2007-198) Adopted on 22 January 2009. *EFSA Journal*. v. 957, p. 1–29.

EISEN, E. J.; BOHREN, B. B.; MCKEAN, H. E. The Haugh Unit as a measure of egg albumen quality. *Poultry Science*, v. 41, p. 1461–1468, 1962.

FEBERWEE, A.; LANDMAN, W. A novel eggshell pathology induced by *Mycoplasma synoviae*. *World Poultry*, v. 24, n. 7, p. 22-23, 2008. Disponível em: <[www.worldpoultry.net](http://www.worldpoultry.net)>. Acesso em: 27 out. 2010.

FEBERWEE, A.; MORROW, C. J.; GHORASHI, S. A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; LANDMAN, W. J. M. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D 1466. *Avian Pathology*, v. 38, n. 5, p. 333-340, 2009a.

FEBERWEE, A.; VRIES, T. S.; LANDMAN, W. J. M. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathology*, v. 37, n. 6, p. 629-633, 2008.

FEBERWEE, A.; WIT, J. J.; LANDMAN, W. J. M. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology*, v. 38, n. 1, p. 77-85, 2009b.

FERGUSON, N. M.; HEPP, H.; SUN, S.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H.; GARCÍA, M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology*, v. 151, p. 1883–1893, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 21/01/2015.

FRAGA, A. P.; VARGAS, T.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S. K.; CELMER, A. J.; MARQUES, E. K.; LUNGE, V. R. 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*, v. 44, n. 2, p. 505–510, 2013.

FREY, M., HANSON, H.P.; ANDERSON, D.P. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *American Journal of Veterinary Research*, v. 29, p. 2163-2171, 1968.

GANAPATHY, K.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M. Pathogenicity of in vivo-passaged *Mycoplasma imitans* in turkey poultts in single infection and in dual infection with rhinotracheitis virus. *Avian Pathology*, v. 27, p. 80—89, 1998.

GENBANK. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

GOMES, A. M. *Caracterização molecular de Mycoplasma da avicultura industrial dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo*. Belo Horizonte, 2013. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-9KPPZE>> Acesso em: 06 jan. 2015.

HU, F. B.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E.B.; MANSON, J.E.; ASCHERIO, A.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. A.; SPIEGELMAN, D.; SPEIZER, F. E.; SACKS, F.M.; HENNEKENS, C. H.; WILLETT, W. C. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Journal of the American Medical Association*, v. 281, n. 15, p. 1387-1394, 1999.

HUMPHREY, T. J.; WHITEHEAD, A. Egg age and the growth of *Salmonella* Enteritidis PT4 in egg contents. *Epidemiology and Infection*, v. 111, n. 2, p. 209–219, 1993.

HUMPHREY, T. J.; WHITEHEAD, A.; GAWLER, A. H. L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection*, v. 106, n. 3, p. 489–496, 1991.

JEFFERY, N.; GASSER, R. B.; STEER, P. A.; NOORMOHAMMADI, A. H. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiology*, v. 153, p. 2679–2688, 2007.

JEON, E. O.; KIM, J. N.; LEE, H. R.; KOO, B. S.; MIN, K. C.; HAN, M. S.; LEE, S. B.; BAE, Y. J.; MO, J. S.; CHO, S. H.; LEE, C. H.; MO, I. P. Eggshell apex abnormalities associated

with *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Journal of Veterinary Science*, v. 15, n. 4, p. 579-582, 2014.

JIN, Y. H.; LEE, K. T.; LEE, W. I.; HAN, Y. K.. Effects of storage temperature and time on the quality of eggs from laying hens at peak production. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, v.24, n. 2, p.279-284, 2011.

KLEVEN, S. H.; EIDSON, C. S.; FLETCHER, O. J. Airsacculitis induced in broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. *Avian Diseases*, vol. 22, p.707-716, 1978.

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*, 11<sup>th</sup> ed. Iowa State: University Press, Ames, Iowa, USA, 2003. p. 719-766.

KOUTOULIS, K. C.; KEFALAS, G.; MOUTTOTOU, N.; DE GUSSEM, K.; THEODOSIOU, D. Efficacy of tylosin tartrate on mycoplasma infections and Eggshell Apex Abnormalities in layer hens under field conditions. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, v. 8, n. 4, p. 246-252, 2013.

LAUERMAN, L. H. *Mycoplasma PCR Assays: Nucleic Acid Amplifications Assays for diagnosis of animal diseases*. Department of Agriculture and Industries, Alabama. 1998. 150p.

LAUERMAN, L. H.; HOERR, F. J.; SHARPTON, A. R.; SHAH, S. M.; VAN SANTEN, V. L. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*,v. 37, n. 3, p. 829-834, 1993.

LAWLOR, J. R.; GAUDETTE, N.; DICKSON, T; HOUSE, J. D. Fatty acid profile and sensory characteristics of table eggs from laying hens fed diets containing microencapsulated fish oil. *Animal Feed science and Tecnology*, v. 156, n. 3-4, p. 97-103, 2010.

LEANDRO, N.S.M.; DEUS, H.A.B.; STRINGHINI J.H.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A.; CARVALHO, F.B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. *Ciência Animal Brasileira*, v. 6, n. 2, p. 71-78, abr./jun. 2005.

LOCKABY, S. B; HOERR, F. J.; LAUERMAN, L. H.; KLEVEN, S, H, Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, v. 35, n. 3, p. 178-90, 1998.

LOCKABY, S.B.; HOERR, F.J. Virulence of *Mycoplasma synoviae* in poultry: a review. *Poultry Science*, v.55, p.175-185, 1999.

MACHADO, L. M.; NASCIMENTO, E. R.; SILVA, R. C. F.; SANTOS, F. F.; BARRETO, M. L.; LEMOS, M.; PEREIRA, V. L. A.; TOLEDO, F. G. M.; CRUZ, A. C. M. PCR para *Mycoplasma synoviae* em poedeiras caipiras e comerciais com doença respiratória. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25º, 2009, Ipojuca. *Anais eletrônicos...* Ipojuca: SBM, 2009, id. 2252-2. Disponível em: <<http://www.prixeventos.com.br/hotsite/site/default.asp?EventoID=115>>. Acesso em: 11 nov. 2010.

MÉXICO. Secretaría de Salud. Norma oficial mexicana NOM-159-SSA1-1996, Bienes y Servicios. *Huevo, sus productos y derivados*. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Disponível em: <<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/159ssa16.html>>.

MIZUMOTO, E. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MACHADO F. M. V. F. Avaliação química e sensorial de ovos obtidos por diferentes tratamentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 60-65, 2008.

MOALIC, P. Y.; KEMPF, I.; GESBERT, F.; LAIGRET, F. Identification of two pathogenic mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, p. 171-174, 1997.

MORROW, C.J.; BELL, I.G.; WALKER, S.B.; MARKHAM, P.F.; THORP, B.H.; WHITHEAR, K. G. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. *Australian Veterinary Journal*, v.67, p.121-4, 1990.

NASCIMENTO, E. R. Micoplasmose Aviária . *Informe Técnico Biovet*, n.29, p. 1-3, 2006.

NASCIMENTO, E. R. *Mycoplasma synoviae* em Avicultura – Implicações Econômicas: Conviver ou Erradicar. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas, SP. Anais... Campinas: Facta. 2001. v. 01, p.31 - 44.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A; BARRETO, M. L.; MACHADO, L. S.; ABREU, D. L. C.; SOARES, M. V.; BRANDÃO, M. D . M.; OGINO, L. L.; SANTOS, F. F. PCR multiplex para detecção de *Mycoplasma* spp. e diferenciação entre cepas virulenta e MG-F vacinal de *Mycoplasma gallisepticum*. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia – 2011. Resumo:2032-1. Acesso em: 24 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R2032-1.html>>.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K. R.; TAIT, R. C. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v. 35, n. 1, p. 62-69, 1991.

NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, E. R. Estocagem e sobrevivência de várias espécies de micoplasmas a -20°C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, 1984, Belém. *Anais...* Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária Sociedade dos Médicos Veterinários do Pará, 1984. p. 307.

NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F.; VASCONCELOS, M. P.; BARRETO, M. L.; ALMEIDA, J. F.; CAMPOS, C. A. M.; PEREIRA, V. L. A. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 3, p. 297-301, 2005a.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. IN: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das aves*, Campinas: FACTA, 1104p., 2009, 485-502p.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M.G. F.; BARRETO, M. L. Avian mycoplasmosis update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. v.7, n.1, p. 1-9, 2005b.

NOORMOHAMMADI, A. H.; MARKHAM, P. F.; KANCI, A.; WHITHEAR, K. G.; BROWNING, G. F. A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, v. 35, p. 911–923, 2000.

NZFSA – New Zealand Food Safety Authority. *Food Labelling Requirements for Eggs and Egg Products*. January, 2009. Disponível em: <<http://www.foodsafety.govt.nz/industry/sectors/poultry-eggs/eggs/food-standards-code-requirements.htm>>.

OLIVEIRA, D. L.; NASCIMENTO, J. W. B.; CAMERINI, N. L.; SILVA, R. C.; FURTADO, D. A.; ARAUJO, T. G. P. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, n.11, p.1186–1191, 2014.

RAMÍREZ, A. S.; NAYLOR, C. J.; PITCHER, D. G.; BRADBURY, J. M.. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, v. 128, p. 279–287, 2008.

RANCK, M. F.; SCHMIDT, V.; PHILIPP, H. C.; VOSS, M.; KACZA, J.; RICHER, A.; FEHLHABER, K.; KRAUTWALD-KUNGHANNS, M. E. *Mycoplasma synoviae*-associated egg-pole shell defects in laying hens. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, v. 123, n. 3-4, p. 111-118, 2010.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R.; KLEVEN, S. H. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence as a Novel Tool for Epizootiological Studies. *Avian Diseases*, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.



RAZIN, S.; TULLY, J. G. *Methods in mycoplasmaology*, volume 1: Mycoplasma characterisation. New York: S. Academic Press, 1983.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. In: *Molecular Characterization*. San Diego, California/USA: Academic Press, 1995. p. 215-95.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and Pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology*, v.62, p. 1094-156, 1998.

ROBERTS, D. H.; McDANIEL, J. W. Mechanism of egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 77, n. 4, p.439-42, 1967.

ROBERTS, J.R. Factors affecting egg internal quality and eggshell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science*, v. 41, p. 161-177, 2004.

RODRIGUEZ-NAVARRO, A.; KALIN, O.; NYS, Y.; GARCIA-RUIZ, J. M. Influence of the microstructure and crystallographic texture on the fracture strength of hen's eggshells. *Poultry Science*, v. 43, p.395–403, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor (NY): Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

SAMLI, H.E.; SENKOYLU, N.; OZDUVEN, M.L. Effects of Storage Time on Egg Quality of Laying Hens Fed on the Diets with Various By-Product Oils from the Oilseed Extraction Refinery. *Pakistan Journal of Nutrition*, v.5, n.2, p.406-409, 2006.

SANTOS, F. F.; BRANDÃO, M. D. M.; SILVA, C. C.; MACHADO, L. S.; SOARES, M. V.; BARRETO, M. L.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Eggshell Apex Abnormalities in a Free-range Hen Farm with *Mycoplasma synoviae* and Infectious Bronchitis virus in Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.16, n.2, p. 101-104, 2014.

SANTOS, F.F.; GOUVEA, R.; SANTOS, L.M.M.; BORGES, A.; FREITAS, M.Q.; PEREIRA, V.L.A. Consumer preference for chicken egg type: free-range, commercial or

omega-3 enriched. In: 24o World's Poultry Congress, 2012, Salvador. World's Poultry Science Journal, v. 68, p. 170-172, 2012.

SCOTT, T.A.; SILVERSIDES, F.G. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*, v.79, n.12, p.1725–1729, 2000.

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. Fisiopatologia do sistema reprodutor. In: BERCHIERI JR, A; MACARI, M. Doença das aves. Campinas: FACTA, 2009. Cap. 3.8, 1.104p.

SESTI, L.A .C. Filosofias e conceitos de Biossegurança e doenças com potencial de risco para a avicultura brasileira. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, *Anais...Campinas* : FACTA, 2001,v. 1, p.47-91.

SHAPIRO, D.P. *Observations of mycoplasmosis in an integrated poultry operation*. In: Poultry Mycoplasma Workshop, American College of Poultry Veterinarians, Western Poultry Disease Conference, University of California; 1994; .Davis, Califórnia, USA.

SILVA, C.C.; BRANDÃO, M.D.M.; NASCIMENTO, E.R.; ALMEIDA, J.F.; ABREU, D.L.C.; BARRETO, M.L.; SOARES, M.V.; MACHADO, L.S.; PEREIRA V.L.A. *Mycoplasma gallinarum* in laying hens with respiratory disease. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(4):347-350, 2014.

SOARES, M. V.; NASCIMENTO, E. R.; ABREU, D. L. C.; EIRAS, C.; SANTOS, F. F.; SILVA, C. C.; GOUVÊA, R.; MACHADO, L. S.; PEREIRA, V. L. A. PCR Multiplex for differential diagnosis of *Mycoplasma gallinarum*, *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. In: *62nd Western Poultry Disease Conference*. Sacramento, CA . 2013.

SOLOMON, S.E. *Egg & Eggshell quality*. Aylesbury:Wolfe Publishing, 1997, 149p.

SPRYGIN, A.V.; ANDREYCHUK, D. B.; KOLOTILOV, A. N.; VOLKOV, M.S.; RUNINA, I.A.; MUDRAK, N. S.; BORISOV, A. V.; IRZA, V. N.; DRYGIN, V. V.; PEREVOZCHIKOVA, N. A. 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 Pathology*, v. 39, n. 2, p.99-109, 2010.

SRIKANTIA, S.G. *The use of biological value of a protein in evaluating its quality for human requirements*. Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. Rome, 5 to 17 October 1981. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/MEETING/004/M2835E/M2835E00.HTM>>. Acesso em: 30 out. 2014.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. *Review Science Technology*. OIE. v. 15, p. 1495-525, 1996.

STRUGNELL, B.W.; McMULLIN, P.; WOOD, A. M.; NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R.; IRVINE, R. M. Unusual eggshell defects in a free-range layer flock in Great Britain. *Veterinary Record*, v. 169, p. 237-238, 2011.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos*. Ed. Guanabara & Koogan, 11. ed., 856p, 1993.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TOGASHI, C.K.; KAKIMOTO, S.K.; SOARES, N.M. Avaliação dos danos nas cascas de ovos da postura ao processamento. *Avicultura Industrial*, n.05, p.41-4, 2009.

UBABEF. *Relatório anual*. 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso em: 21 jan. 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. *Egg-grading manual Agricultural Handbook*. Washington: Department of Agriculture. 2000. 56p. (Agricultural Marketing Service, 75). Disponível em: <<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004502>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

VAN IMMERSEEL, F.; NYS, Y.; BAIN, M. *Improving the safety and quality of eggs and egg products*. Volume 2: Egg safety and nutritional quality. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011. 408 p.

VÉRAS, A. L.; VELLOSO, C. B. O.; MATIOTTI, T. G.; FARIA, T. C. Avaliação da qualidade interna de ovos armazenados em dois ambientes em diferentes tempos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Supl. 5, p. 55, 2000.

WANG, H.; FADL, A. A.; KHAN, M. I. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Molecular and Cellular Probes*, v. 11, p. 211–216, 1997.

WEAVER, R. F. *Molecular Biology*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. 890p.

WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University, 1994. 173 p.

WHO/FAO. Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens. 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y4392e/y4392e00.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

WIDDICOMBE, J. P.; RYCROFT, A. N.; GREGORY, N. G. Hazards with cracked eggs and their relationship to egg shell strength. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, n. 2, p. 201-205. 2009.

YAGIHASHI, T.; NUNOYA, T.; OTAKI, Y. Effects of dual infection of chickens with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallinaceum* or Infectious Bursal Disease virus on infectious synovitis. *Japan Journal of Veterinary Science*, v. 45, n. 4, p. 529-532, 1993.

YAGIHASHI, T.; NUNOYA, T.; OTAKI, Y. Effects of dual infection of chickens with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallinaceum* or Infectious Bursal Disease virus on infectious synovitis. *Japan Journal of Veterinary Science*, v. 45, n. 4, p. 529-532, 1993.

YAMAMOTO, R. Mollicutes. In: BIBERSTIEIN, E. L. & ZEE, Y. C. Review of *Veterinary Microbiology*. USA: Blackwell scientific Publications. 1990. p.213-227.

ZHAO, S.; YAMAMOTO, R. Amplification of *Mycoplasma iowae* using polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v. 37, n. 1, p. 212-217, 1993b.

ZHAO, S.; YAMAMOTO, R. Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v. 36, n. 1-2, p. 91-97, 1993a.

## 6 ANEXO

### 6.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comitê de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 199, intitulado “Mycoplasma synoviae como fator de risco no aparecimento de anormalidades no ápice da casca de ovos de galinha na região Sudeste” sob a orientação do Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Léo de Almeida Pereira do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em 17 de maio de 2012.

Niterói, 17 de maio de 2012.

Presidente da C.E.U.A.