

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS
DE ORIGEM ANIMAL**

CÁTIA CARDOSO DA SILVA

**QUALIDADE DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS COM
Mycoplasma gallinarum ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM
A CEPA VACINAL H120 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA
DAS GALINHAS**

Niterói, RJ
2013

CÁTIA CARDOSO DA SILVA

QUALIDADE DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS COM *Mycoplasma gallinarum* ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM A CEPA VACINAL H120 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária.

Campo de Confluência: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA
Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública – UFF

Co-orientador: Prof^º. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO
Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública – UFF

Niterói, RJ
2013

CÁTIA CARDOSO DA SILVA

**QUALIDADE DE CARÇAÇAS DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS COM
Mycoplasma gallinarum ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM A CEPA
VACINAL H120 DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária.

Campo de Confluência: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Virginia Léo de Almeida Pereira – UFF
Orientadora

Prof^o. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – UFF
Co-orientador

Prof^o. Dr. Rogério Tortelly – UFF

Dr^a. Rita de Cássia Figueira Silva – PESAGRO-RIO

Niterói, RJ
2013

Aos meus pais, Manoel e Edileuza. Ensinaram-me
com exemplos que sem luta não há vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, pelo eterno auxílio em minha caminhada;

À minha família, pelo apoio, carinho, amor e incentivo contínuo;

Ao meu noivo Raphael, pela compreensão, paciência e amparo em mais uma etapa das nossas vidas;

À Prof^a. Dr^a. Virginia Léo de Almeida Pereira, pela orientação, colaboração, conselhos e por ser um modelo profissional para mim;

Ao Prof^o. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, pela co-orientação, pelo apoio e colaboração com seus bons e indispensáveis ensinamentos;

Às Prof^a Dr^a Dayse Lima da Costa Abreu e Prof^a Dr^a Juliana Ferreira de Almeida pela amizade e pela ajuda prestadas;

À Prof^a Dr^a Maria Lúcia Barreto, pelo carinho e apoio em todos os momentos que precisei;

Ao Prof^o. Dr. Rogério Tortelly, pela colaboração especial na interpretação das lesões microscópicas;

Ao Dr. Lauerman por enviar as sequências de “primer” para *Mycoplasma gallinarum* e protocolo da PCR;

Aos meus colaboradores imprescindíveis e amigos Felipe Faccini, Tiago Faria, Mariane Verinaud e Daniela Sabroza;

Aos meus amigos e também auxiliares em todos os sentidos Mariza Brandão, Hugo Peralva, Selene Karol, Raquel Gouvêa, Rita de Cássia, Leandro Machado, Lídia Marques, Beatriz Cardoso, Camila Serva, Mariana Thomaz, Samira Mesquita, Simone Machado, Liana Lumi, Wilker Rocha, Liz Gonçalves, Júlio César Queiroz, Davi Almeida, Wanda Meira, Aline Moreno, Fernanda Eliege, Michelle Nana, Mariana Bacellar e Eduardo Nogueira;

Às secretarias do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Veterinária, Celeste e Beth pelo carinho e atenção;

As prestadoras de serviço de limpeza Célia e Ana pelo respeito e carinho;

À FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro;

A todas as Irmãs, pensionistas e amigas do Centro Social Vicenta Maria por toda acolhida repleta de amor.

*Grandes descobertas e progressos invariavelmente
envolvem a cooperação de várias mentes.*

Alexander Graham Bell

RESUMO

A avicultura brasileira é considerada a maior do mundo em exportação e a terceira em produção de carne de frango. Os avanços no manejo, genética e biossegurança contribuíram para o aumento da produtividade no setor avícola, mas a acentuada produção elevou o risco de disseminação de doenças respiratórias, como as micoplasmoses aviárias e a Bronquite Infecciosa das Galinhas. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (MM) são patógenos indiscutíveis e de preocupação para a Indústria Avícola, entretanto *M. gallinarum* (MGA) tem sido considerado comensal. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de frangos de corte infectados com cepa autóctone de MGA isoladamente ou em combinação com o vírus vacinal (cepa H120) da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG). Foram criados 96 pintos de corte desde um dia de idade da linhagem Cobb, livres de micoplasmas. Foram utilizados quatro grupos de 24 frangos, mantidos em unidades isoladoras: Grupo 1 (G1), não infectados, nem vacinados; Grupo 2 (G2), infectados com cepa autóctone de MGA; Grupo 3 (G3), vacinados contra BIG com vacina comercial cepa H120 (Bio-bronk-vet[®], Biovet,SP), Grupo 4 (G4), infectados com cepa autóctone de MGA e vacinados contra BIG. A infecção por MGA foi monitorada pela PCR e a vacinação contra BIG, confirmada pela RT-PCR. Foi feito o registro do consumo de ração pelo período do experimento. Semanalmente foram retirados aleatoriamente quatro frangos de cada grupo, pesados individualmente e submetidos à coleta de sangue e à necropsia para a obtenção de amostras para análises laboratoriais. Foram coletados fragmentos de traqueia, pulmão, sacos aéreos, fígado, coração, musculatura do peito, rins e trato digestivo, acondicionados em formol a 10% para histopatologia. As amostras de raspado de traqueias foram reunidas em “pools” por grupo e submetidas à detecção de MGA, MG, MS por isolamento e pela PCR e de vírus da BIG pela RT-PCR. As amostras de soros, obtidas a partir do sangue, foram submetidas ao ELISA para MG, MS e BIG. O ganho de peso diário foi calculado a partir do peso médio obtido dividido pelo número de dias de idade dos frangos. O consumo de ração entre os grupos estudados foi similar até aos 42 dias de idade. As diferenças para peso médio final e ganho de peso entre os grupos estudados não foram significativas (ANOVA, $p > 0,05$). Todas as amostras foram negativas para micoplasmas ao isolamento. À PCR todas as amostras analisadas foram negativas para MG e MS. Já para MGA as amostras foram positivas em G2 (no 35º dia de idade) e em G4 (14º, 35º, e 42º dias de idade) e negativas, em G1 e G3. À RT-PCR, as amostras foram positivas nos grupos vacinados contra BIG, em G3 no sétimo e no 42º dia de idade e em G4, no sétimo, 14º, 35º e 42º dias de idade. Ao ELISA, todos os grupos foram negativos para MG e MS e para BIG obtiveram títulos nas análises de primeiro dia, creditados a anticorpos maternos, decrescendo no sétimo dia e negativos a partir do 14º dia de idade em todos os grupos. À necropsia, em G1 e G3 não foram observadas lesões dignas de nota. Nos demais grupos foram observados ascite, exsudato catarral na traqueia, aerossaculite, hidropericárdio, pneumonia, sinovite, e miopatia peitoral em número variável de aves entre os grupos e de acordo com as idades estudadas. As diferenças nas frequências de lesões macroscópicas entre os grupos foram significativas (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$). Ao exame histopatológico, nas aves de G2, foi observada pneumonia, com nódulos múltiplos peribronquiais de característica linfóide e diâmetros variáveis e em G4, foram observados miodegeneração vacuolar acompanhada de atrofia e necrose muscular do peito e reação inflamatória focal associada à necrose no pulmão. O MGA isoladamente não se mostrou capaz de provocar doença aparente nos frangos de corte infectados, embora tivesse produzido lesões pulmonares na etapa final de criação e quando associado à vacina contra a BIG houve o aparecimento de lesões passíveis de condenação que podem comprometer a qualidade dos frangos de corte ao abate.

Palavras chave: Micoplasmas, frango de corte, Histopatologia

ABSTRACT

Brazil is the world's largest exporter and third largest producer of poultry meat. Advances in management, biosecurity and genetics have contributed to the increase in productivity of the poultry industry, which was responsible for the pronounced production, increasing the risk of respiratory diseases spreading, such as avian mycoplasmosis and Infectious Bronchitis. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) and *M. meleagridis* (MM) are recognized as indisputable pathogens for the poultry industry, however *M. gallinarum* (MGA) has been considered commensal. The aim of this study was to evaluate broilers quality when infected with autochthonous MGA strain, alone or in combination with Infectious Bronchitis (IBV) vaccine. There were raised 96 mycoplasma free Cobb broiler birds since one day of age. They were separated out into four groups of 24 birds and kept in isolation units: Group 1 (G1), uninfected and unvaccinated; Group 2 (G2), infected with autochthonous MGA strain; Group 3 (G3), vaccinated with commercial IBV strain H120 (Bio-bronk-vet®, Biovet, SP); Group 4 (G4), infected with MGA and vaccinated with commercial IBV. The infection was monitored for MGA by PCR and IBV vaccination was confirmed by RT-PCR. The feed intake record was taken for the entire period of the experiment. Weekly, four broilers were randomly taken from each group, individually weighed and submitted for blood sampling and necropsy for the obtaintion of samples for laboratory analysis. There were collected fragments of trachea, lungs, air sacs, liver, heart, chest muscles, kidneys and digestive tract and fixed in 10% formalin for histopathology. Tracheal scrapings were pooled for each group and subjected to detection of MGA, MG, MS by isolation and PCR and IBV detection by RT-PCR. Serum samples were subjected to ELISA for MG, MS and IBV. Weight gain was calculated by weight mean divided by the number of days of the birds life. Feed intake among groups were similar up to 42 days of age. The differences in final weight mean and weight gain among groups were not significant (ANOVA, $p > 0.05$). All samples were negative for mycoplasma isolation. By PCR all samples were negative for MG and MS. As for MGA, samples were positive in G2 (at the 35th day of age) and G4 (14th, 35th, and 42^{sd} days of age) and negative in G1 and G3. By RT-PCR, the samples were positive in groups vaccinated against IBV in G3 (at the 7th and 42^{sd} days of age) and G4 (7th, 14th, 35th and 42^{sd} days of age). By ELISA, all groups were negative for MG and MS whereas for IBV, the reaction titles obtained at first, were credited to maternal antibodies, mainly because they decreased seven days later and became negative at 14 days of age in all groups. At necropsy, the gross lesions were not noteworthy in G1 and G3, but on the other groups it was observed ascitis, catarrhal exsudate in the trachea, airsacculitis, hydropericardium, pneumonia, synovitis, and pectoral myopathy in variable number of birds among groups and according to bird age. The differences in the frequencies of gross lesions among groups were significant (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). By histopathology, it was observed pneumonia with multiple nodules in G2 while in G4, it observed characteristic peribronchial lymphoid with variable diameters, vacuolar muscle degeneration accompanied by muscle atrophy and breast necrosis, and inflammation associated with focal necrosis in the lung. The MGA alone was not capable of causing apparent disease in infected broilers, although it yielded pulmonary lesions in the final stage of rearing. When associated with BIG vaccine MGA caused lesions capable of condemnation, that may compromise the quality of broilers at slaughter.

Keywords: Mycoplasmas, Broiler, Histopathology

SUMÁRIO

RESUMO, p. 5

ABSTRACT, p. 6

1 INTRODUÇÃO, p. 12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 14

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO BRASIL, p. 14

2.2 IMPORTÂNCIA DOS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS EM FRANGOS DE CORTE,
p. 15

2.3 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS, p. 16

2.3.1 Características gerais, p. 16

2.3.2 *Mycoplasma gallinarum*, p. 17

2.3.3 Diagnóstico das Micoplasmoses aviárias, p. 19

2.3.4 Controle da Micoplasmoses aviárias, p. 20

2.4 BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS, p. 21

2.5 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO, p. 22

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 24

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, p. 24

3.2 PESAGEM DOS FRANGOS, p. 25

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS, p. 25

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS, p.26

3.4.1 Isolamento de *Mycoplasma* spp, p. 26

3.4.2 PCR para detecção de Micoplasmas, p. 26

3.4.2.1 Extração de DNA, p. 26

3.4.2.2 PCR para *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. gallinarum*, p. 27

3.4.3 RT-PCR para detecção do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, p. 28

3.4.3.1 Extração de RNA, p. 28

3.4.3.2 RT-PCR, p. 28

3.4.4 ELISA, p.29

3.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS, p.30

3.5.1 Alterações macroscópicas, p. 30

3.5.2 Exame histopatológico, p. 30

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 31

3.6.1 Estatística Descritiva, p. 31

3.6.2 Estatística Analítica, p. 31

4 RESULTADOS, p. 32

5 DISCUSSÃO, p. 39

6 CONCLUSÃO, p. 42

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Unidades isoladoras localizadas no Biotério Experimental do Laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), p. 24
- FIGURA 2 Ascite observada no grupo infectado com MGA (G2) aos 21 dias de idade, p. 33
- FIGURA 3 Traqueia com exsudato catarral observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade, p. 33
- FIGURA 4 Sinovite observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 28 dias de idade, p. 34
- FIGURA 5 Miopatia peitoral observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade, p. 34
- FIGURA 6 Aerossaculite e pneumonia observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade, p. 35
- FIGURA 7 Frango de corte. Nódulos múltiplos peribronquiolar de característica linfóide e diâmetros variados. Observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade. H.E. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X, p.37
- FIGURA 8 Frango de corte. Broncopneumonia focal. Múltiplas áreas de necrose bronquiolar (SETA) observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. H.E. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X, p.37
- FIGURA 9 Frango de corte. Miopatia peitoral. Miodegeneração vacuolar acompanhada de atrofia e necrose muscular observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. H.E. 100X, p.38

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 “Primers” utilizados na PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. gallinarum*, sequência, tamanho do produto amplificado e referência, p. 27

TABELA 1 Peso médio e ganho de peso diário de frangos de corte não vacinados nem infectados (G1); infectados com MGA (G2); vacinados contra BIG (G3) e infectados com MGA e vacinados contra BIG (G4), p. 32

TABELA 2 Frequência de lesões macroscópicas observadas em frangos de corte não vacinados nem infectados (G1); infectados com MGA (G2); vacinados contra BIG (G3) e infectados com MGA e vacinados contra BIG (G4), p. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
DN	Doença de Newcastle
EDTA	“Ethylenedicaminetetracetic acid”
HI	Reação da Inibição da Hemaglutinação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
MGA	<i>Mycoplasma gallinarum</i>
pb	Pares de Base
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PESAGRO-RIO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RT-PCR	“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”
SAL	Soroaglutinação Lenta
SAR	Soroaglutinação Rápida
SDS	Solução Dodecil Sulfato de Sódio
SIF	Serviço de Inspeção Federal
Taq	“ <i>Thermus aquaticus</i> ”
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFF	Universidade Federal Fluminense

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira, com décadas de crescimento intenso, tornou-se a maior do mundo em exportação e a terceira em produção de carne de frango. E isso se deve a articulação entre os diferentes elos da cadeia produtiva, destacando-se o investimento em biosseguridade nos plantéis do Brasil, que é reconhecido internacionalmente pelos altos padrões de qualidade e sanidade dos produtos e subprodutos avícolas (UBABEF, 2012). Por isso a preocupação do governo frente às questões sanitárias é constante. Em 1994 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) cujas ações em conjunto com as empresas do setor garantem a segurança dos plantéis, potencializando e reforçando ainda mais o aumento da produtividade para o mercado externo (BRASIL, 1994).

A intensificação da produção contribuiu para a produtividade e eficiência da indústria avícola, porém como consequência aumentou o risco de disseminação das doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos. Dentre as doenças importantes em avicultura destacam-se, especialmente, as que afetam o sistema respiratório das aves, por causarem um impacto sobre o custo de produção de frangos (GAMA, 2004).

Dentre as doenças respiratórias, as micoplasmoses são consideradas como doenças prioritárias no PNSA quanto ao controle e/ou erradicação nos plantéis avícolas. Em aves, as infecções micoplásmicas têm sido reconhecidas pelas formas clássicas de enfermidades: Doença Respiratória Crônica (DRC) das galinhas, Sinusite infecciosa dos perus, Sinovite infecciosa e Aerossaculite das aves (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Essas enfermidades são frequentemente associadas à infecção por *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (MM). Estes agentes são admitidos como patogênicos e de preocupação para a Indústria Avícola por causarem doenças agudas ou crônicas, e infecção inaparente em galinhas, perus e em outras aves. A doença respiratória crônica em frangos de corte provoca decréscimo na taxa de crescimento e no ganho de peso, perdas por condenações de carcaças. Outras espécies de micoplasmas não são comumente relacionadas a doenças e a prejuízos econômicos (KLEVEN, 2008).

O *Mycoplasma gallinarum* (MGA), por ser considerado um microrganismo com aparente apatogenicidade, não é comumente pesquisado e são poucos os estudos sobre essa espécie de micoplasma. Entretanto, algumas pesquisas associaram o MGA às doenças respiratórias nas aves, principalmente quando em combinação com vírus respiratórios patogênicos, incluindo os vírus vacinais da Doença de Newcastle (DN) e da Bronquite

Infecciosa das Galinhas (BIG) ou autóctone da BIG em frangos de corte, comprometendo o desempenho das aves (KLEVEN et al., 1978; SHAD-MAJID, 1996). Além desses relatos prévios, em 2011 houve um caso de doença respiratória em poedeiras comerciais no Estado do Rio de Janeiro, negativas para MG e MS, em que o único agente detectado foi MGA, sugerindo que as manifestações clínicas, bem como as lesões observadas, poderiam estar relacionadas à sua presença (PEREIRA et al., 2011).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade de frangos de corte infectados com cepa autóctone de MGA isoladamente ou em combinação com o vírus vacinal da BIG.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO BRASIL

A produção de carne de frango chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, em um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas (UBABEF, 2012).

A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem crescendo. Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial, a carne de frango terá 48,1% das exportações mundiais. Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina e de frango (MAPA, 2012).

A condição de grande produtor e exportador mundial de frango coloca o Brasil como competidor no mercado mundial de produtores avícolas (MARTINS, 2001). Para que o Brasil consiga manter esse patamar é imprescindível o investimento em pesquisa e desenvolvimento que incluam técnicas de manejo e introdução de novas tecnologias, capacitação profissional e fortalecimento de políticas públicas que visem à sanidade animal, sustentabilidade, rastreabilidade e segurança alimentar são cruciais para atender mercados com exigências mais rigorosas (LIMA et al., 2012).

De acordo com Sesti (2001) a alteração nos padrões de qualidade pode representar perdas significativas no mercado de exportação e na imagem da avicultura nacional, sendo que a saúde animal é uma das principais barreiras não tarifárias para o embargo das exportações do Brasil ao resto do mundo. A intensificação da produção contribuiu para a produtividade e eficiência da indústria avícola, porém como consequência aumentou o risco de disseminação das doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos. Dentre as doenças importantes em avicultura destacam-se, especialmente, as que afetam o sistema respiratório das aves, por causarem um impacto sobre a qualidade e o custo na produção de frangos (GAMA, 2004).

2.2 IMPORTÂNCIA DOS PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS EM FRANGOS DE CORTE

As doenças infecciosas na avicultura, particularmente, as doenças respiratórias de etiologia viral exercem um impacto econômico significativo no mundo todo, relacionados à diminuição do crescimento, comprometimento da qualidade e da produção de ovos, mortalidade, condenação no abate e gastos com insumos incluindo diagnóstico, vacinas e antimicrobianos usados para eliminar infecções bacterianas intercorrentes (ASSIS et al., 2003; MORETTI, 2006).

A principal função do sistema respiratório das aves é a troca gasosa entre o ar atmosférico e a corrente sanguínea (FEDDE, 1998). Relacionam-se ainda a esse sistema, a regulação térmica e fonação. A narina é a porta de entrada do trato respiratório, seguindo pela laringe e traqueia (INOUE; CASTRO, 2009). O sistema respiratório das aves possui mecanismos de defesa contra partículas inaladas que devem ser preservados para o melhor combate as enfermidades desses órgãos (FEDDE, 1998; MACARI; GIVISIEZ, 2002). Nos meses frios, a doença respiratória é mais frequente e severa em aves jovens, enquanto que nas adultas está relacionada com queda da postura (METTIFOGO; FERREIRA, 2007).

Os sacos aéreos são os órgãos mais suscetíveis às enfermidades do sistema respiratório. No processo de respiração das aves, os sacos aéreos filtram as partículas presentes no ar atmosférico e parte do gás inalado move-se diretamente para os sacos aéreos craniais (MACARI; GIVISIEZ, 2002). Quando os mecanismos de defesa naturais, como a presença de muco e o batimento dos cílios traqueais, são vencidos, o trato respiratório das aves torna-se susceptível à ação dos patógenos (INOUE; CASTRO, 2009).

Quando os sacos aéreos sofrem danos, tornam-se espessos, esbranquiçados, exsudato caseoso e microscopicamente observam-se infiltrados de células inflamatórias (FICKEN, 1996). As carcaças de aves com evidência de envolvimento extensivo dos sacos aéreos com aerossaculite ou aquelas com comprometimento sistêmico, deverão ser condenadas totalmente. As carcaças menos afetadas podem ser rejeitadas parcialmente após a remoção e condenação completa de todos os tecidos envolvidos com a lesão, incluindo o exsudato. As vísceras sempre serão condenadas totalmente, em caso de aerossaculite (BRASIL, 1998).

A aerossaculite é uma lesão frequentemente associada à micoplasmose e à colibacilose, embora possa estar presente em outras doenças respiratórias (ALENCAR et al., 1998; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Dentre as doenças com grande potencial de ocasionar as mais severas perdas em termos de mortalidade, estão aquelas causadas por estirpes de alta virulência do vírus da DN e do vírus da Influenza Aviária. Além dessas, três

outras doenças respiratórias virais também possuem significativa importância em termos de severidade de lesões produzidas, tal como a Laringotraqueíte Infecciosa, a Síndrome da Cabeça Inchada por metapneumovirus aviária e a BIG, sendo que todas essas enfermidades virais podem ser prevenidas através da utilização de vacinas (MONTASSIER, 2012).

2.3 MICOPLASMOSES AVIÁRIAS

2.3.1 Características gerais

Micoplasmas são microrganismos caracterizados pela ausência de parede celular, decorrente da falta de informação genética para sua síntese, fato este que distingue das bactérias verdadeiras. Os micoplasmas pertencem à classe *Mollicutes*, família *Mycoplasmataceae*, gênero *Mycoplasma* (JORDAN; PATTISON, 1996; TIMENETSKY, 2009).

Os microrganismos do gênero *Mycoplasma* têm formato cocóide, cocobacilar ou pleomórficos, medem 200 a 300 nm e têm outras particularidades, como colônias na forma mamilar ou de ovo frito, capacidade de reter o corante Dienes ao contrário das outras bactérias (KLEVEN, 2008; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Além disso, esses microrganismos tendem a crescer muito lentamente, geralmente se desenvolvendo em temperaturas entre 37-38°C em até 21 dias e são bastante resistentes ao acetato de tálio e penicilina, os quais são empregados usualmente nos meios de cultura para retardar o crescimento de bactérias e fungos contaminantes (KLEVEN, 2008).

As micoplasmoses aviárias são enfermidades causadas por micoplasmas, os menores procariontes (bactérias) conhecidos, que se assemelham em tamanho, aos grandes vírus (cerca de 300nm). Esses microrganismos têm predileção pelas membranas mucosas e serosas das aves, onde provocam problemas respiratórios, articulares e urogenitais. As formas clássicas dessas enfermidades são a DCR das galinhas, a Sinusite Infecciosa dos perus, a Sinusite Infecciosa e Aerossaculite das aves (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Algumas espécies têm importância econômica para a indústria avícola por causarem doenças, quer como o único agente patogênico ou, mais frequentemente, em associação com outros agentes patogênicos (JORDAN; PATTISON, 1996, TIMENETSKY, 2009).

Existem 22 espécies do gênero *Mycoplasma* reconhecidas como infecciosas para aves, mas somente os MG e MS em galinhas e perus e também o MM e MI em perus foram estabelecidas como patógenos das aves domésticas. A patogenicidade de outras espécies não

tem sido demonstrada, exceto em condições experimentais como MGA associado com agentes virais infecciosos como o vírus da BIG, podendo causar aerossaculite em frangos de corte (JORDAN; PATTISON, 1996; TIMENETSKY, 2009).

Os micoplasmas são transmitidos horizontalmente por aerossóis, por via venérea, durante o acasalamento ou inseminação artificial, por contágio direto com outras aves ou indireto por intermédio de pessoas, animais e fômites. Verticalmente, esses microrganismos são transmitidos pelo ovo. Após a liberação pelos folículos maduros no ovário, os oócitos se contaminam após o contato com os sacos aéreos abdominais afetados, antes de atingirem o infundíbulo. Subsequentemente pode haver a contaminação do oviduto pelo ovo infectado, ocasionando a infecção de outros ovos (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

As doenças causadas por micoplasmas podem ser agudas, mas são normalmente crônicas e é comum a infecção inaparente, somente evidenciada por testes diagnósticos (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A micoplasmose acarreta grandes perdas econômicas na avicultura brasileira e mundial devido à doença respiratória crônica em frangos de corte que provoca decréscimo na taxa de crescimento e no ganho de peso, perdas por condenações de carcaças, bem como custos com profilaxia e uso de drogas terapêuticas. Em reprodutoras provoca redução na produção e eclodibilidade de ovos e nas poedeiras comerciais redução na produção e perda na qualidade dos ovos (GAMA et al., 2005).

2.3.2 *Mycoplasma gallinarum*

O MGA foi a primeira espécie de micoplasma a ser descrita (EDWARD; FREUNDT, 1956) e designado sorotipo B aviário (DIERKS et al., 1967; EDWARD; FREUNDT, 1956). Essa espécie cresce bem em todos os meios de cultura utilizados no isolamento de micoplasmas aviários, e têm todas as características comuns ao gênero *Mycoplasma*, incluindo morfologia celular, aspecto de colônia, ausência de parede celular e requerimento de colesterol para sobreviver. Ele não fermenta glicose, mas reduz tetrazólio e hidrolisa arginina (KLEVEN et al., 2008).

Esse agente acomete uma ampla diversidade de hospedeiros, como suínos, ovinos e bovinos; embora, este microrganismo seja geralmente associado às aves (BENCINA et al., 1987; DOVC et al., 1991; ROBINSON; DIENTER, 1968; ROBINSON et al., 1968; SINGH; UPPAL, 1987; WANG et al., 1990). A colonização persistente e distribuição entre diferentes espécies de animais demonstram que essa espécie tem um mecanismo exclusivo de adaptação.

A baixa patogenicidade e as fracas respostas imunológicas do hospedeiro sugerem que o MGA apresenta um mecanismo único para escapar da resposta imune do hospedeiro. Diferentemente das outras espécies de micoplasmas, esse microrganismo tem um perfil único de proteína quanto à adesão celular e aquisição de nutrientes. MGA seria potencialmente capaz de adaptar-se em diferentes tipos de hospedeiros devido à presença de múltiplas cópias de aminopeptidases, catabolismo de ácidos orgânicos associados a proteínas e uma grande quantidade de proteínas transportadoras (WAN et al., 2010).

O MGA é considerado de distribuição mundial (KLEVEN et al., 2008). Poveda et al. (1990) em um estudo epizootiológico no sul da Espanha detectaram o MGA como a espécie de *Mycoplasma* com maior frequência durante uma investigação realizada com diferentes espécies de aves. Há relatos de isolamento de MGA no trato respiratório de frangos de corte (KLEVEN et al., 1978) e de galinhas caipiras (SHAD-MAJID, 1996) e em embriões de galinha (SHAD-MAJID, 1994). No trato reprodutivo de aves, o MGA já foi isolado do infundíbulo magno, istmo e glândula da casca, sugerindo a possibilidade de transmissão pelo ovo (WANG et al., 1990). Varley e Jordan (1978) observaram lesões articulares em perus infectados experimentalmente com MGA na fase embrionária.

MGA não tem sido considerado uma espécie patogênica de micoplasma aviário, embora esta espécie seja frequentemente isolada do trato respiratório de frangos de todas as idades (JORDAN, 1979) e existam relatos consistentes de isolamento de MGA em sacos aéreos e traqueias de frangos de corte que foram condenados por aerossaculites (KLEVEN et al., 2008).

Alguns estudos sugerem um papel benéfico de MGA para seu hospedeiro aviário. Taylor-Robinson e Cherry (1971) relataram que culturas de MGA produziram um efeito protetor no epitélio traqueal, pois retardaram a perda de células ciliadas desenvolvidas pelo MG em comparação com o controle, não tratado. Além disso, foi sugerido que o MGA exerce uma inerente atividade probiótica, influenciando outros microrganismos, e retardaria o aparecimento da Síndrome do Fígado Gordo e Hemorrágico em poedeiras comerciais (BRANTON et al., 2003).

Kleven et al. (1978) investigaram pela primeira vez o potencial de patogenicidade do MGA em combinação com vírus respiratórios patogênicos, incluindo os vírus vacinais de DN e BIG e/ou com o vírus autóctone de BIG. Os resultados revelaram que os frangos desenvolveram aerossaculites, comprometendo o desempenho das aves.

Shah-Majid (1996) pesquisou os efeitos da associação entre vírus de DN (cepa F) com o MGA e as possíveis alterações no epitélio da traqueia de frangos de corte através de

microscopia eletrônica. Neste estudo o epitélio traqueal dos frangos com três dias de idade, vacinados contra DN e infectadas com MGA, no mesmo dia, apresentaram alterações significativas como: perda de células ciliadas, presença de muco e fibrina e as aves que foram desafiadas mais tardiamente não apresentaram alterações relevantes. O efeito isolado do MGA no epitélio traqueal não foi avaliado, necessitando de maiores investigações.

Em 2011, houve um caso de doença respiratória em poedeiras comerciais no Estado do Rio de Janeiro, negativas para MG e MS, em que o único agente detectado foi MGA, sugerindo que as manifestações clínicas e as lesões observadas, como conjuntivite, traqueíte, aerossaculite, perihepatite e, em alguns casos, peritonite, poderiam estar relacionadas à sua presença (PEREIRA et al., 2011).

Técnicas laboratoriais mais modernas foram aplicadas na detecção do MGA como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), análise do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) (LAUERMAN et al., 1995), PCR em Tempo Real (LEIGH; EVANS, 2009). Contudo, poucas pesquisas são encontradas sobre MGA, porque este microrganismo é usualmente considerado como uma espécie não patogênica. A atual falta de informações sobre MGA requer um estudo mais aprofundado para avaliar a sua importância nas criações avícolas.

2.3.3 Diagnóstico das Micoplasmoses aviárias

O diagnóstico presuntivo da infecção por micoplasmas pode ser: epidemiológico, pela análise dos dados concernentes a morbidade, mortalidade e parâmetros de produção, coletados durante a investigação de um surto ou em um monitoramento; clínico, pela observação dos sinais e sintomas; anatomopatológico, através da interpretação das lesões macro e microscópicas e etiológico, feito pelo isolamento e tipificação sorológica com anti-soro para cada espécie de micoplasma por métodos de imunofluorescência ou imunoperoxidase ou técnicas moleculares, como a “Polymerase Chain Reaction” – PCR (CHARLTON et al., 1996; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A Soroaglutinação Rápida (SAR), a Soroaglutinação Lenta (SAL), o teste de Reação da Inibição da Hemaglutinação (HI) e “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA) são métodos sorológicos que podem ser empregados no diagnóstico das micoplasmoses. Para o isolamento, coletam-se fragmentos de tecidos lesados, principalmente sacos aéreos e traqueias, exsudato sinovial e ocular, suabes de traqueia ou da fenda palatina, imersos em cerca de 1,5 mL em meio Frey líquido. Essas amostras são muito utilizadas em cultivo, também utilizando o meio Frey, e/ou PCR para auxiliar os testes de SAR e HI no monitoramento da infecção por MG ou MS. Além

disso, podem ser realizadas provas de tipificação, imunofluorescência direta ou indireta de colônias, imunoperoxidase e inibição de crescimento para a tipificação das espécies (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Os testes baseados em biologia molecular como a PCR podem tanto detectar quanto tipificar o agente, sem necessidade de um cultivo prévio, e por isso passou a desempenhar um papel de grande importância no diagnóstico laboratorial (MADIGAN et al., 2004). Entre as vantagens do diagnóstico molecular, destacam-se a rapidez, a especificidade, a segurança dos resultados, a possibilidade de detecção de agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento, detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos, detecção antes da indução de uma resposta imunológica e em hospedeiros imunocomprometidos, demonstrando vantagens sobre os testes sorológicos (MORENO, 2009).

2.3.4 Controle das Micoplasmoses aviárias

No Brasil, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) apresenta nos seus objetivos específicos o controle e/ou erradicação da micoplasmose aviária por ser esta uma das enfermidades que representa barreira sanitária na comercialização dos produtos avícolas. O PNSA define medidas de monitoramento da micoplasmose em estabelecimento avícolas, de controles permanentes e eventuais, que realizam o comércio ou a transferência nacional e internacional de seus produtos destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. No caso do comércio internacional, os estabelecimentos avícolas devem estar certificados como livres de micoplasmose aviária (BRASIL, 2001).

Apesar da adoção de tais programas, as infecções por MG, MS e MM, especialmente MG e MS, continuam a ocorrer em frangos de corte, galinhas poedeiras, perus e aves reprodutoras (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Os micoplasmas são sensíveis a maioria dos desinfetantes (amônia quaternária, compostos iodados, fenólicos, álcool), bem como aos antimicrobianos que interferem na síntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e metabolismo dos lipídios (KLEVEN, 2008).

Existem vacinas comerciais contra MG e MS, inativadas e vivas, a disposição dos criadores de aves (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). A vacina viva é aconselhável para poedeiras e não deve ser usada em reprodutoras (galinhas e perus) por prejudicar o diagnóstico e, principalmente, o monitoramento epidemiológico (BALÉM et al., 1992; BRASIL, 1994). O maior inconveniente no uso de vacinas vivas é que confundem o

diagnóstico sorológico e podem dificultar a pesquisa etiológica, aspectos relacionados aos programas de controle governamentais (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A terapia com antimicrobianos, principalmente com aqueles que se acumulam em altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório, como tiamulin e enrofloxacin , afeta o diagnóstico etiológico da micoplasmose aviária, por inibir ou reduzir a resposta imune e por indisponibilizar os micoplasmas do trato respiratório superior, chegando, em muitos casos, a níveis zero de anticorpos e isolamento tanto em frangos de corte quanto em aves de reprodução ou postura (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

2.4 BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

A BIG é uma doença viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete aves da espécie *Gallus gallus*. O agente etiológico da BIG é um RNA vírus, que pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus* (MONTASSIER, 2012).

Três diferentes genes são responsáveis por codificar as principais proteínas estruturais do vírus da BIG, que são a glicoproteína de superfície (S), da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N), sendo que a classificação sorológica ou genotípica do vírus é baseada nas características da glicoproteína S (CALLISON et al., 2006).

A importância da BIG se deve as perdas econômicas como retardo no crescimento, aumento na susceptibilidade a infecções secundárias, infertilidade, diminuição na produção de ovos, e em alguns casos, mortalidade moderada a severa (DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009).

Os sinais clínicos da BIG ocorrem predominantemente no trato respiratório e reprodutivo das aves. A manifestação clínica da doença no trato respiratório é caracterizada principalmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares, conjuntivite e sinusite. Em relação às lesões macroscópicas mais comuns provocadas pelo vírus são a presença de exsudato seroso, catarral mucoso na traqueia, aerossaculite pneumonia e às vezes, na dependência especialmente da virulência e do patótipo da estirpe do vírus da BIG envolvida, podem surgir alterações patológicas como nefrite, nefrose, epididimite e ooforite e salpingite. Todas essas lesões podem ser confirmadas à microscopia, mas não são patognomônicas da doença. São encontradas na traqueia, perda dos cílios, infiltrados de heterófilos e linfócitos. Se os sacos aéreos são envolvidos, podem ser observados edema, descamação epitelial e exsudato fibrinoso. Nos rins, as lesões são principalmente aquelas de nefrite intersticial, com degeneração granular, vasculização e descamação no epitélio tubular. No oviduto ocorre perda

de cílios, infiltração por linfócitos e outras células mononucleares, edema e fibroplasia de mucosa em todas as regiões do órgão (CAVANAGH; GELB JR, 2008).

O controle da BIG é obtido por vacinação das aves através do uso de vacinas vivas atenuadas e inativadas (DI FÁBIO; BUITRAGO, 2009). A cepa Massachusetts (M41), H120 e outras vacinas do sorotipo Massachusetts são amplamente utilizadas em todo o mundo. Novos tipos posteriormente podem ser incluídos quando a prevalência do novo tipo é estabelecida (CAVANAGH; GELB JR, 2008). No desenvolvimento de vacinas contra BIG, não se usaram muitas cepas, inicialmente Massachusetts e Connecticut, e desde 1983 agregaram-se três sorotipos Arkansas, Florida e JMK; vacinas elaboradas com estas três cepas podem ser utilizadas somente na forma restrita, nos estados onde sua aplicação foi especialmente autorizada (CUBILLOS, 2009). No Brasil é permitido apenas o uso do sorotipo viral Massachusetts (MONTASSIER, 2012). A prevenção da BIG é um problema para a indústria avícola mundial, pois a proteção cruzada contra o desafio com diferentes sorotipos não é eficiente, os quais induzem pouca ou nenhuma proteção cruzada entre si (CALLISON et al., 2006).

O tecido respiratório é um importante mecanismo de proteção local à resposta imune ao vírus da BIG. No entanto, a presença de anticorpos locais na prevenção de re-infecção é incerta (CAVANAGH; GELB JR, 2008). A infecção ou a vacinação contra BIG estimulam a produção de anticorpos IgG, IgM e IgA. Além dos anticorpos, são desencadeados processos de proliferação e ativação de células T efectoras que secretam citocinas com ações moduladoras de linfócitos T e B (MONTASSIER, 2012).

Os anticorpos maternos podem reduzir tanto a severidade da reação vacinal como a eficácia da vacina contra BIG, se a cepa vacinal for a mesma utilizada na imunização das matrizes. Apesar disso os pintos de um dia de idade são vacinados rotineiramente (CAVANAGH; GELB JR, 2008).

2.5 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO

A qualidade geral da carne de frango depende de vários fatores, entre eles o efeito das doenças infecciosas que podem afetá-la em diferentes graus. Em função do grande desenvolvimento no setor avícola, a preocupação com os aspectos higiênico-sanitários dos produtos é fundamental (SILVA, 2004). O cuidado e a adoção de corretas práticas de higiene em todas as etapas do processo produtivo, passando pelas de criação, transporte, processamento industrial, distribuição, armazenamento, até atingir o consumidor final do

alimento, influenciam a qualidade e a segurança do produto final oferecido ao consumidor. É importante destacar que a presença de patógenos nas carcaças de aves é originária, fundamentalmente, da ave viva e não do ambiente industrial (LEITÃO, 2001).

Para garantir a qualidade e confiabilidade dos produtos e subprodutos no mercado globalizado, é necessária a implementação de medidas sanitárias, que serão responsáveis por proporcionar ao consumidor um produto final isento de microrganismos e toxinas prejudiciais à saúde (QUEVEDO, 2005).

No Brasil, todos os processos de abate e industrialização de aves, sob o controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF), devem ser baseados nos planos de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e nos planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (DELAZARI, 2001). O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelece os procedimentos higiênico-sanitários e as especificações de localização, detalhes construtivos e operacionais dos matadouros avícolas (SILVA, 2005).

As causas patológicas específicas de condenação podem ser de origem infecciosa ou não (PONTES, 2004). E incluem inúmeras doenças e síndromes que deixam lesões, quase nunca patognomônicas, generalizadas, ou simplesmente, reduzem o rendimento das aves sem, necessariamente representar riscos à saúde do consumidor (BARCELOS, 2005). A Portaria nº 210 de 1998 estabelece os critérios técnicos da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves, determinando as lesões que causam condenação das aves durante o abate (BRASIL, 1998).

Os fiscais sanitários removem da linha de abate as carcaças que apresentam qualquer sinal de doença ou outra condição que afete a sua aparência. Para efeito de classificação de causas de condenação, os inspetores são treinados para o reconhecimento visual dos seguintes problemas na linha de inspeção dos abatedouros: abscessos, aerossaculite, artrite, aspecto repugnante, caquexia, celulite, colibacilose, neoplasias, salpingite, septicemia, ascite e síndrome hemorrágica. Dependendo da lesão, os inspetores executam a condenação parcial ou total das carcaças afetadas (BRASIL, 1998; PONTES, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo experimental, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFF (projeto nº181/2012), no Biotério Experimental do Laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). As amostras foram processadas no Laboratório de Sanidade Avícola e no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF.

Foram criados 96 pintos de corte de um dia de idade, da linhagem Cobb, livres de micoplasmas, divididos em 04 grupos de 24 aves mantidas em unidades isoladoras com ar filtrado e pressão positiva (FIGURA 1). Os grupos foram definidos e identificados como: Grupo 1 (G1), não infectados, nem vacinados; Grupo 2 (G2), infectados com cepa autóctone de MGA; Grupo 3 (G3), vacinados contra BIG com vacina comercial cepa H120 (Bio-Bronkvet[®], Biovet,SP); Grupo 4 (G4), infectados com cepa autóctone de MGA e vacinados contra BIG. A cepa autóctone de MGA foi isolada de poedeiras comerciais de uma granja industrial no Estado do Rio de Janeiro. No primeiro dia de idade por via intranasal (2×10^8 CCU MGA/0,05mL) os frangos de corte dos grupos G2 e G4 foram infectados com a MGA. Em G3 e G4 os frangos também foram vacinados contra BIG no primeiro dia de idade por via ocular.

Durante todo o experimento foram fornecidas as aves, ração e água a vontade. O tipo de ração respeitou o período de criação dos frangos, inicial, crescimento e final.



FIGURA 1 Unidades isoladoras localizadas no Biotério Experimental do Laboratório de Sanidade Avícola da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF)

3.2 PESAGEM DOS FRANGOS

Os frangos de todos os grupos foram pesados semanalmente, aos 14, 21, 28, 35 e 42 dias de idade, individualmente, em balança graduada com 40 g de intervalo. Dos pesos obtidos foi calculado o peso médio dos frangos e registrados em fichas próprias. O Cálculo do ganho de peso diário foi realizado a partir do peso médio obtido em cada pesagem dividido pelo número de dias de idade dos frangos (MENDES E PATRICIO, 2004). As rações fornecidas para cada grupo foram semanalmente pesadas, em balança graduada com 40 g de intervalo, para cálculo do consumo de ração do início até o final do experimento.

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Semanalmente, a partir dos sete dias de idade, eram retirados, aleatoriamente, quatro frangos de corte de cada grupo e coletadas 10 amostras de sangue para obtenção do soro. Os frangos de corte eram sangrados por punção da veia braquial, com auxílio de seringas e agulhas descartáveis, e coletado um volume de 2,5 mL de sangue. Os soros obtidos eram acondicionados em microtubos, inativados a 56° C por 30 minutos e estocados à -20°C até serem submetidos ao ELISA para MG, MS e BIG.

Em seguida, os quatro frangos de corte de cada grupo foram eutanasiados por desarticulação atlanto-occipital e necropsiados em capela de fluxo laminar com auxílio de materiais cirúrgicos esterilizados para coleta da porção inicial da traqueia de cada grupo. As amostras de traqueias foram colocadas em placas de Petri estéreis e abertas com auxílio de tesoura ponta reta e pinça estéreis. Foi feito o raspado dessas traqueias com auxílio de lâmina de bisturi para formação de um “pool” das amostras de cada grupo. Cada “pool” foi acondicionado em tubo com tampa de rosca contendo 4,0 mL de meio Frey. Foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, acondicionada em microtubo com volume para 1,5 mL encaminhado para detecção de micoplasmas pela PCR e vírus de BIG pela RT-PCR. O restante (3,0mL) do “pool” de traqueia foi utilizado para o isolamento de micoplasmas. Fragmentos de órgãos de traqueia, pulmão, sacos aéreos, fígado, coração e de lesões macroscópicas observadas na musculatura do peito, rins e sistema digestório foram acondicionados em frascos contendo formol a 10% e encaminhados para exame histopatológico.

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.1 Isolamento de *Mycoplasma* spp

Para o isolamento de micoplasmas, as amostras foram diluídas até 10^{-5} em meio de Frey modificado 200 μ L da amostra na maior diluição foram semeados em 2 mL de meio líquido de Frey modificado e em meio sólido. Os cultivos foram incubados em estufa bacteriológica sob microaerofilia a 37°C e observados diariamente por 21 dias com o intuito de visualizar a mudança de cor do meio líquido e crescimento de colônias em forma de “ovo frito”, típicas de micoplasmas ao microscópio estereoscópio.

3.4.2 PCR para detecção de Micoplasmas

Os “pools” de amostras de raspado de traqueia de todos os grupos foram submetidos à PCR para detecção de MG, MS e MGA. Essas análises foram realizadas para monitoramento da ausência de MG e MS em todos os grupos e para confirmar a infecção por MGA em G2 e G4 e ausência em G1 e G3.

3.4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de traqueia foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio (adaptado de SAMBROOK et al., 1989). As amostras foram homogeneizadas por cinco segundos e depois centrifugadas por 20 minutos, a 13.500 rotações por minuto (rpm) a 10°C em centrífuga refrigerada (Thermo Electron Corporation PK121R). O sobrenadante de cada microtubo foi descartado e utilizou-se o sedimento de 40 μ L que foi adicionado de 400 μ L de tampão Tris-ETA dextrose, 30 μ L de solução aquosa de Proteinase K e 30 μ L de solução Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%. As amostras foram colocadas em bloco térmico (QUIMIS) a uma temperatura de 50°C a 55°C por 30 minutos e posteriormente banhadas em gelo por cinco minutos para parar a reação. Em seguida, foram adicionadas de 500 μ L de fenol e homogeneizadas por inversão por 15 minutos. Depois foram centrifugadas por 30 minutos, a 13.500 rpm, a 10°C. Na sequência, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 500 μ L de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas suavemente por três minutos e centrifugadas novamente nas mesmas condições já descritas. Depois, o sobrenadante foi retirado e

transferido para um novo microtubo, adicionado de 1,0 mL de álcool etílico e mantido a -20°C “overnight”. No dia seguinte, essas amostras foram centrifugadas por 20 minutos em 13.500 rpm a 10°C e o álcool foi descartado. Após a secagem dos microtubos, o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de tampão Tris-ETA (TE), pH 7,6 e estocados no freezer a -20°C até a utilização na PCR.

3.4.2.2 PCR para *M. gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *M. gallinarum*

Foram utilizados “primers” específicos de micoplasmas (QUADRO 1), amostras padrões de MG (ATCC 19610), MS (WVU 1853) e MGA (GM67StrainPG16) foram utilizadas como controles positivos (QUADRO 3). A PCR foi preparada em microtubo que continha: 61,5µL de água Mili-Q; 10µL de tampão PCR 10X; 4µL de MgCl₂ (50 mM); 5µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 2µL de cada “primer”, 15µL de amostra de DNA e 0,5µL (5U/µL) de Taq Polimerase, totalizando 100 µL.

O ciclo para reação foi programado em termociclador (“Thermo Electron Corporation PX2 Thermal Cycler”) e realizado nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, sendo seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/ 1 minuto, anelamento a 55°C/ 1 minuto e extensão a 72°C/ 2 minutos, seguindo-se uma extensão final de 72°C/ 10 minutos. Para obtenção dos resultados, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética a 94V em gel de agarose a 1,5% submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e posteriormente corado em brometo de etídio. Os resultados foram visualizados em transiluminador (EB-20E-Ultra-Lum, Inc. Carson, Califórnia) de luz ultravioleta.

QUADRO 1 “Primers” utilizados na PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. gallinarum*, sequência, tamanho do produto amplificado e referência

“Primer”*	Sequência	Produto	Referência
MG B1	5’CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC3’	481pb	Nascimento et al., 1991
MG B2	5’GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT3’		
MS-f	5’GAGAAGCAAAATAGTGATATCA3’	207 pb	Lauerman, et al., 1993
MS-r	5’CAGTCGTCTCCGAAGTTAACA3’		
MGA-f	5’ATAGCAGTTGGAAACAACACTAT 3’	293 pb	Lauerman et al., 1993; 1995
MGA-r	5’AGTTTACAACCCATAGGGCC 3’		

* MG B1, MG B2-*Mycoplasma gallisepticum*, MS-f, MS-r-*Mycoplasma synoviae* e MGA-f, MGA-r-*Mycoplasma gallinarum*

3.4.3 RT-PCR para detecção do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas

As mesmas amostras de raspado de traqueia foram submetidas à RT-PCR para recuperação do vírus vacinal da BIG. Essa análise foi realizada para detectar o vírus vacinal da BIG em G3 e G4 e sua ausência em G1 e G2.

3.4.3.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol[®], seguindo a orientação do fabricante. O RNA viral foi extraído a partir de 300 µL do “pool” de raspado de traqueia. A essas amostras foram adicionados 700 µL de *Trizol[®] Reagent (Invitrogen)* que foram homogeneizadas rapidamente durante cinco minutos a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação foram centrifugadas em 13.500 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foram precipitadas com 500 µL de isopropanol, homogeneizadas brevemente e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Novamente, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. A seguir, as amostras foram lavadas lentamente com 200 µL de etanol 75% e centrifugadas em 13.500 rpm a 4°C por 2 minutos. Logo após a centrifugação, o etanol 75% foi descartado, as amostras foram lavadas cuidadosamente com 200 µL de etanol absoluto, foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas e o etanol absoluto foi descartado. Após estes procedimentos, os microtubos foram secos, o sedimento foi ressuspenso em 25 µL de água ultrapura estéril livre de nuclease e as amostras foram estocadas no freezer a -20°C até serem utilizados na RT-PCR.

3.4.3.2 RT-PCR

Para detecção da BIG foi utilizado o seguinte par de “primers”: IBV5GL533 reverse 5' GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT 3' e IBV5GU391 forward 5' GCT TTT GAG CCT AGC GTT 3', que amplificam um segmento de 143 pb da região 5'UTR dos coronavírus aviários (CALLISON, 2006). A RT-PCR foi realizada com o Kit *Access QuickTM RT-PCR System (Promega)* conforme as instruções do fabricante. A reação foi preparada em microtubo que continha: 18 µL de água Mili-Q; 25 µL de *Access QuickTM*, 1,5 µL de cada *primer*, 1 µL de AMVr e 3 µL de RNA, totalizando 50 µL.

O ciclo para reação da RT-PCR foi programado em termociclador (“Thermo Electron Corpotation PX2 Thermal Cycler”) e realizado nas seguintes condições: 40°C por 50 minutos, seguido de desnaturação inicial de 95°C/ 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C/ 1 minuto, anelamento a 55°C/ 1 minuto e extensão a 72°C/ 30 segundos, depois extensão final de 72°C/ 10 minutos.

Para obtenção dos resultados, as amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos realizados na PCR.

3.4.4 ELISA

O ELISA foi realizado para a detecção de anticorpos específicos nos soros obtidos, com o objetivo de monitorar a ausência de resposta contra MG e MS e conferir a resposta sorológica para o vírus da BIG durante o experimento. Foram utilizados os “kits” comerciais da série Flock Chek[®] (IDEXX Laboratories, Inc., EUA), conforme as instruções do fabricante.

Os reagentes foram deixados até alcançarem a temperatura ambiente (18°C a 25°C) e então foram homogeneizados através de inversão e movimentos circulares suaves. As amostras de soro foram diluídas em proporção 1:500 com Diluente de Amostra antes de serem testadas, os controles não foram diluídos. Foi utilizada uma ponteira para cada amostra, as amostras foram homogeneizadas antes de serem distribuídas nas placas impregnadas com o antígeno específico.

Foi desenhado um modelo da microplaca e a posição das amostras de soro em cada cavidade da microplaca foi registrada por escrito. Foram transferidos 100 µL de Controle Negativo não diluído para as cavidades A1 e A2, 100 µL de Controle Positivo não diluído para as cavidades A3 e A4 e 100 µL de cada amostra diluída para as cavidades previamente definidas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada a etapa de lavagem das cavidades adicionando aproximadamente 350 µL de água destilada e desprezando o conteúdo por três a cinco vezes. Após a lavagem, 100 µL de conjugado anti-galinha em cada cavidade e as microplacas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a reação, 100 µL de Solução de Interrupção foram distribuídos em cada cavidade para parar a reação. Em seguida, a leitora foi zerada com ar e a placa foi colocada no aparelho para medição dos valores de absorbância com comprimento de onda de 650 nm - A(650).

Para validação do ensaio, a diferença entre a média do Controle Positivo e a média do Controle Negativo (PCx – NCx) deve ser maior que 0,075. O Controle Positivo, padronizado, representa níveis significantes de anticorpos contra MG, MS e BIG em soro de galinha. A absorvância media do Controle Negativo deve ser menor ou igual a 0,150. A presença ou ausência de anticorpos contra MG, MS e o vírus da BIG foi determinada pela relação do valor A(650) da amostra com a média do Controle Positivo (S/P). Coeficientes maiores que 0,5 foram considerados positivos e indicaram exposição aos antígenos testados. Os títulos relacionaram S/P em uma diluição 1:500 e foram calculados através do programa fornecido pelo fabricante, pela fórmula: $\text{Log}10^{\text{título}} = 1,09 \times (\text{Log}10^{\text{S/P}}) + 3,36$

3.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

3.5.1 Alterações macroscópicas

Todos os órgãos foram observados detalhadamente e as alterações macroscópicas detectadas foram registradas em fichas individuais de cada grupo. Essas alterações foram avaliadas e a frequência foram analisadas por grupo.

3.5.2 Exame histopatológico

Fragmentos de traqueia, pulmão, sacos aéreos, fígado, coração, musculatura do peito, rins e intestino foram acondicionados em frascos contendo formol a 10% e encaminhados para processamento histopatológico pelas técnicas usuais (inclusão em parafina, cortadas em micrótomo, montagem em lâmina de vidro e coloração pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE) (LUNA, 1968). Posteriormente foram examinadas ao microscópio óptico para detecção ou não de lesões compatíveis as micoplasmoses aviárias.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.6.1 Estatística Descritiva

Os dados de peso final, ganho de peso e consumo de ração foram expressos em médias. As lesões macroscópicas respiratórias foram expressas em frequência nos grupos no dia da necropsia.

3.6.2 Estatística Analítica

As diferenças entre peso final e ganho de peso por grupo foram obtidas pela análise de variância (ANOVA) enquanto que as diferenças nas frequências de lesões macroscópicas entre os grupos foram obtidas pelo Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$), ao nível de erro $\alpha = 0,5\%$.

4 RESULTADOS

As diferenças nos pesos médios finais e no ganho de peso entre os grupos estudados não foram significativas ao longo do experimento (ANOVA, $p > 0,05$) (TABELA 1). Os pesos médios dos frangos de corte atingiram ao final do estudo experimental, 2.306 g em G1, 2.268 g em G2, 2.519 g em G3 e 2.625 g em G4. Apenas em G4 os frangos de corte alcançaram o padrão de peso médio sugerido pelo fornecedor da linhagem utilizada neste estudo. O mesmo ocorreu em relação ao ganho de peso diário dos frangos com 42 dias de idade, somente G4 atingiu 62,5 g, valor sugerido como padrão para a linhagem.

TABELA 1 Peso médio e ganho de peso diário de frangos de corte não vacinados nem infectados (G1); infectados com MGA (G2); vacinados contra BIG (G3) e infectados com MGA e vacinados contra BIG (G4)

Idade (dias)	G1		G2		G3		G4		Padrão COBB	
	PESO (g)	GPD (g)								
7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	164	23,4
14	387	NR	346	NR	395	NR	431	NR	430	30,7
21	756	36,0	790	37,6	756	36,0	862	41,0	843	40,1
28	1.273	45,5	1.383	49,4	1.296	46,3	1.360	48,6	1397	49,9
35	1.950	55,7	1.906	54,5	2.000	57,1	1.850	52,8	2017	57,6
42	2.306	54,9	2.268	54,0	2.519	60,0	2.625	62,5	2626	62,5

GPD= ganho de peso diário; NR= Não realizado

O consumo de ração entre as aves dos grupos estudados foi similar desde os sete até aos 42 dias de idade, com um consumo final de 48,96 Kg por G1, 46,6 Kg por G2, 44,96 Kg por G3 e 47,6 Kg por G4.

Todas as amostras foram negativas para micoplasmas ao isolamento.

À PCR todas as amostras analisadas foram negativas para MG e MS. As amostras dos frangos de G2 foram positivas para MGA, aos 35 dias de idade e de G4, no 14º, 35º e 42º dias de idade. Nas aves de G1 e G3 todas as amostras foram negativas para MGA.

À RT-PCR, as amostras de frangos de G3 foram positivas a partir dos sete dias e aos 42 dias de idade e os de G4, no sétimo, 14º, 35º e 42º dias de idade.

Ao ELISA, as amostras de soros de todos os grupos foram negativas para detecção de anticorpos contra MG e MS. Para o vírus da BIG, na chegada os frangos de corte

apresentaram títulos médios de anticorpos de 1000, com coeficiente de variação de 32%. Com sete dias de idade esses títulos caíram em todos os grupos e foram negativos a partir da 14^o dia de idade até o fim do experimento.

Clinicamente os frangos não apresentaram sinais respiratórios evidentes em nenhum dos grupos estudados.

À necropsia, nas aves do G1, não foram observadas lesões dignas de nota. No G2, houve a presença de hidropericárdio e ascite (FIGURA 2) aos 21 dias de idade em apenas um dos quatro frangos de cortes; e aos 42 dias de idade, dois frangos com pneumonia e transudato gelatinoso nos pulmões, além de exsudato catarral na traqueia (FIGURA 3).

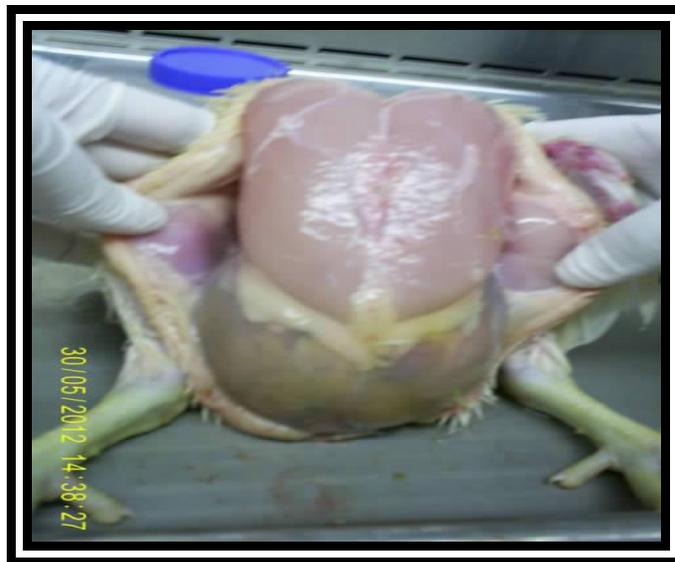


FIGURA 2 Ascite observada no grupo infectado com MGA (G2) aos 21 dias de idade

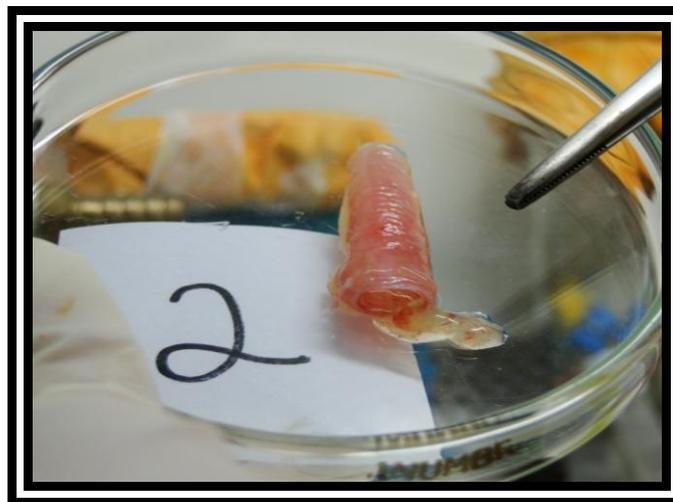


FIGURA 3 Traqueia com exsudato catarral observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade

No G3 foi também não foram observadas lesões relevantes.

Em G4, no 28º dia de idade foi observada sinovite (FIGURA 4) em um frango de corte, hidropericárdio em dois frangos de corte e pneumonia em duas aves avaliadas no 35º dia de idade. No 42º dia em G4, além da pneumonia em todas as aves, um dos frangos apresentou músculo do peito com coloração verde (FIGURA 5), rim aumentado e aerossaculite (FIGURA 6).



FIGURA 4 Sinovite observada no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 28 dias de idade

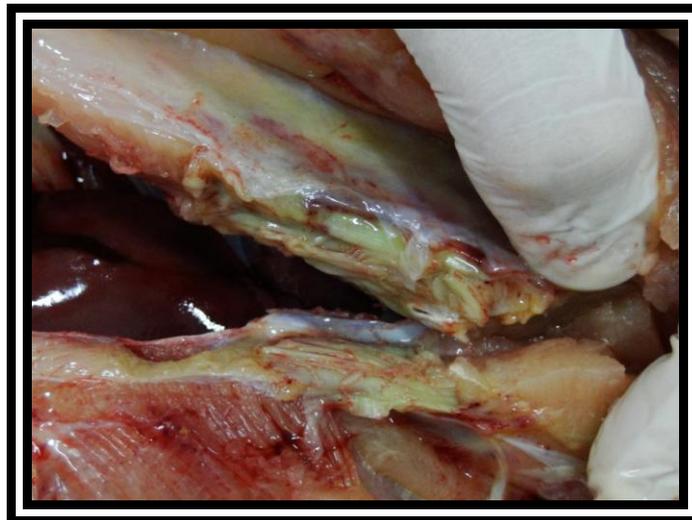


FIGURA 5 Miopatia peitoral observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade



FIGURA 6 Aerossaculite e pneumonia observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade

As lesões macroscópicas foram observadas com mais frequências nos frangos de corte com 42 dias de idade (TABELA 2), nos grupos apenas inoculado com MGA (G2) e infectados com MGA e vacinado contra BIG (G4). As diferenças nas frequências de lesões macroscópicas entre os grupos foram significativas (Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$) (TABELA 2).

TABELA 2 Frequência de lesões macroscópicas observadas em frangos de corte não vacinados nem infectados (G1); infectados com MGA (G2); vacinados contra BIG (G3) e infectados com MGA e vacinados contra BIG (G4)

Grupo	Idade (dias)	Ascite	Exsudato Traqueal	Aerossaculite	Pneumonia	Músculo verde	Total
G1	7	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	14	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	21	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	28	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	35	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	42	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Total		0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
G2	7	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	14	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	21	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	28	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	35	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	42	0/4	1/4	0/4	2/4	0/4	3/4
Total		1/24	1/24	0/24	2/24	0/24	4/24
G3	7	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	14	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	21	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	28	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	35	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	42	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Total		0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24
G4	7	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	14	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	21	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	28	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	35	0/4	1/4	0/4	2/4	0/4	3/4
	42	0/4	1/4	1/4	4/4	1/4	7/4
Total		0/24	2/24	1/24	6/24	1/24	10/24
Total Geral		01/24	3/24	1/24	8/24	1/24	14/96

Teste Mann-Whitney ao nível de erro $\alpha = 0,5\%$, $p < 0,05$

À microscopia, não foram encontradas lesões dignas de nota em G1 e G3. Nas aves de G2, foi observada pneumonia, com nódulos múltiplos peribronquiais de característica linfóide e diâmetros variáveis (FIGURA 7A e 7B). E em G4, foi descrita no pulmão reação inflamatória focal associada à múltiplas áreas de necrose bronquiolar (FIGURA 8A e 8B) e em um dos frangos de corte e uma grave e extensa miodegeneração vacuolar acompanhada de atrofia e necrose no músculo do peito (músculo verde) (FIGURA 9). Em corte transversal a fibra apresentava vacúolos pequenos isolados ora múltiplos de pequeno diâmetro, acentuada destruição muscular com granulação basofílica, focos de calcificação e infiltrados heterofílicos.

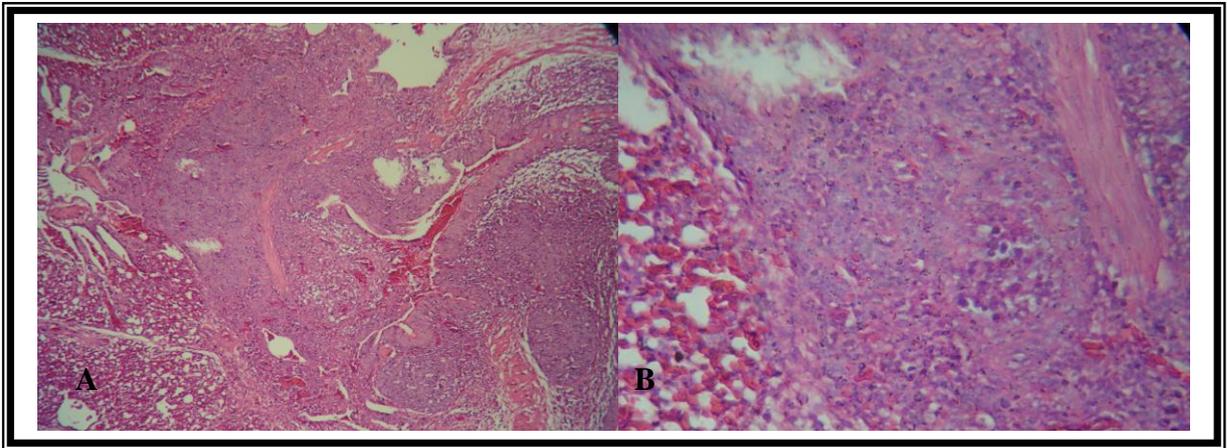


FIGURA 7 Frango de corte. Nódulos múltiplos peribronquiolar de característica linfóide e diâmetros variados. Observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade. H.E. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X

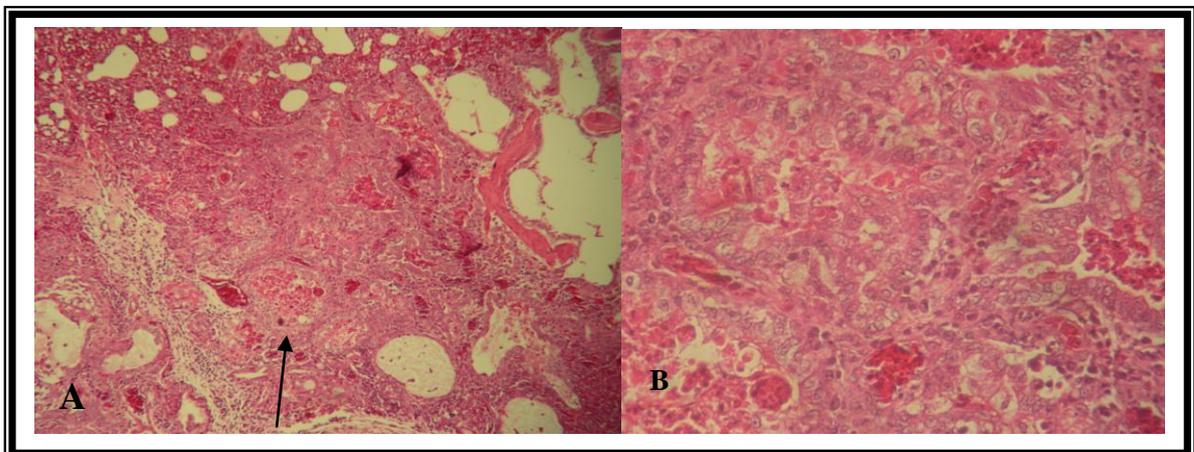


FIGURA 8 Frango de corte. Broncopneumonia focal. Múltiplas áreas de necrose bronquiolar (SETA) observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. H.E. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X

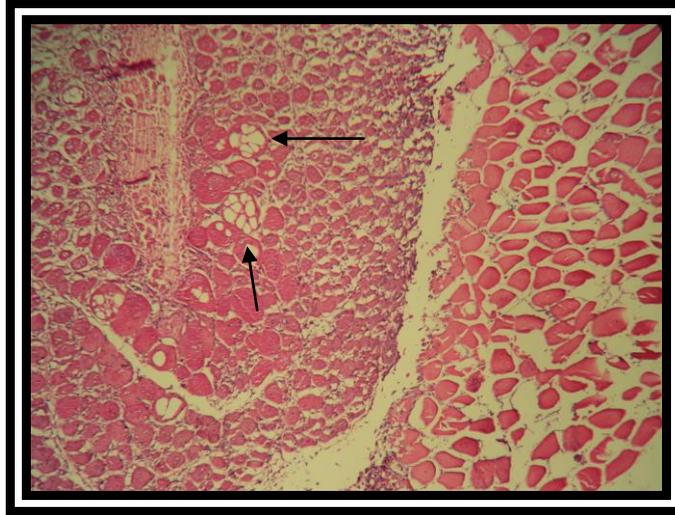


FIGURA 9 Frango de corte. Miopatia peitoral. Miodegeneração vacuolar acompanhada de atrofia e necrose muscular observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. H.E. 100X

5 DISCUSSÃO

A infecção por MGA foi confirmada pela PCR com a detecção do agente nos grupos infectados, embora não se tenha obtido isolamento positivo. De acordo com Salisch et al. (1998) a sensibilidade de PCR para detecção de MG e MS pode ser considerada maior em comparação com o isolamento e isso pode ser levado em consideração na avaliação deste trabalho na detecção de MGA.

A positividade à PCR nas amostras de G4 ocorreu com mais frequência do que nas de G2, grupo apenas infectado com a cepa autóctone de MGA, sugerindo que a vacinação contra a BIG em G4 pode ter influenciado a infectividade de MGA proporcionando uma maior taxa de detecção neste grupo.

O resultado negativo para MG e MS ao ELISA comprovou que os frangos de corte eram livres desses patógenos.

Os resultados ao ELISA para detecção de anticorpos para BIG foram positivos nas aves avaliadas com um dia de idade, o que provavelmente se deveu à presença de anticorpos materno. A partir de sete dias de idade, os títulos de anticorpos decresceram mesmo nos grupos em que as aves foram vacinadas. A provável explicação para o fato seria devido à interferência dos anticorpos maternos aliado ao tempo insuficiente para soroconversão das aves vacinadas contra BIG (CAVANAGH; GELB JR, 2008).

Houve a detecção pela PCR e RT-PCR, respectivamente, de MGA e vírus da BIG nas primeiras semanas após inoculação nas aves dos grupos infectados com MGA ou vacinados contra a BIG isoladamente (G2 e G3) e no grupo onde houve a associação desses agentes (G4). Esses microrganismos se ligam aos sítios de infecção (membranas mucosas e serosas da traqueia) e ainda estavam presentes nesses locais. Nas semanas seguintes os agentes possivelmente estavam em processo de infecção que incluía a interação com células alvos, tornando a detecção mais difícil. Os micoplasmas podem ativar as células do sistema imune, induzindo imunossupressão ou estimulação de linfócitos B e T, e as citocinas indutoras (KLEVEN, 2008). Esse agente pode passar à forma latente e aguardar um estado de debilitação do hospedeiro ou outro fator predisponente para iniciar um quadro mórbido (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Este fato pode justificar a detecção do MGA pela PCR nas mucosas do trato respiratório superior a partir do 35º dia de idade, precedida de resultado negativo até esta idade em G3 e no 21º e 28º dia em G4.

Não foram encontradas lesões macroscópicas e microscópicas significativas nos grupos controle e no grupo apenas vacinado contra a BIG o que caracterizou a inocuidade da

vacina. Entretanto, no grupo infectado com MGA e no grupo infectado com MGA e vacinado contra a BIG foi encontrado maior número de lesões macroscópicas, sendo as lesões mais significativas observadas no grupo que recebeu a associação dos dois agentes, no qual foram descritas aerossaculite, pneumonia, sinovite e miopatia peitoral profunda. As lesões pulmonares e de miopatia peitoral foram confirmadas à microscopia. Shad-Majid (1996) avaliou os efeitos da associação entre o vírus de DN com o MGA e as alterações no epitélio traqueal dos frangos de corte à microscopia eletrônica, e observou perda de células ciliadas, presença de muco e fibrina no epitélio traqueal em frangos com três dias de idade vacinados contra DN e infectados com MGA, no mesmo dia, porém o efeito isolado do MGA no epitélio traqueal não foi avaliado, necessitando de maiores investigações.

Kleven et al. (1978) em um estudo em frangos infectados somente com MGA ou associado a um vírus de campo da BIG ou a uma vacina combinada contra BIG e DN, avaliou apenas as lesões nos sacos aéreos e encontrou a maioria das lesões na primeira semana pós-inoculação, diferente deste estudo, em que foram encontradas lesões nos sacos aéreos apenas em um frango de corte com 42 dias de idade no grupo infectado com MGA e vacinado contra a BIG (G4). No presente estudo, foram encontradas nos frangos de G4 lesões passíveis de comprometimento no desempenho dessas aves e que favorecem depreciação da carcaça constituindo, inclusive, causas de condenação (BRASIL 1998).

A cepa de MGA utilizada neste experimento foi proveniente de um caso clínico de doença respiratória em poedeiras comerciais, em que muitas lesões macroscópicas foram descritas nas aves e não foram encontrados outros agentes respiratórios (PEREIRA et al., 2011). No presente estudo, a cepa de MGA não se mostrou um agente infeccioso patogênico quando presente nos frangos isoladamente, mas o seu efeito sinérgico ficou evidente quando associado à vacina contra a BIG, ampliando as lesões no trato respiratório das aves e contribuindo para o aparecimento de lesões na musculatura de uma das aves (miopatia peitoral profunda), o que tem sido amplamente relacionado à infecção pelo vírus da BIG (BENTRANO et al., 2005; ALMEIDA et al., 2012).

Em relação às outras espécies de micoplasmas, Stipkovits e Kempf (1996) concluíram que o sinergismo do MS com agentes causadores de infecções intercorrentes como os vírus da BIG, da DN e da Influenza A e as bactérias *Escherichia coli*, MG e MM, podem modificar a disseminação da infecção por MS. Minharro et al. (2001) relataram uma elevada frequência de infecções mistas envolvendo *Mycoplasma* spp em lesões de sacos aéreos em frangos de corte, revelaram que 100% das infecções foram devidas à presença de MS e 70% à presença MG em associação com *E. coli*. Os micoplasmas MG e MS sem a intervenção de outros

agentes podem causar infecções brandas e subclínicas (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Porém, após a infecção por MG e/ou MS, as aves tornam-se mais susceptíveis às infecções secundárias por outros agentes como vírus e/ou a *E. coli* (ALENCAR et al., 1998). Há poucas informações sobre MGA e o seu potencial patogênico, sendo necessária a realização de mais estudos a cerca da associação de MGA com agentes infecciosos do sistema respiratório, outros micoplasmas, *E. coli* e vírus respiratórios.

6 CONCLUSÃO

A presença do *Mycoplasma gallinarum* e/ou a vacinação contra a Bronquite Infecciosa das Galinhas não afetaram o peso médio final e ganho de peso e o consumo de ração dos frangos de corte entre os grupos estudados.

A frequência na detecção do MGA pela PCR foi maior em frangos do grupo experimental em que houve associação à cepa vacinal de BIG.

O MGA isoladamente não se mostrou capaz de provocar doença aparente nos frangos de corte infectados, embora tivesse produzido lesões pulmonares na etapa final de criação e quando associado à vacina contra a BIG houve o aparecimento de lesões passíveis de condenação que podem comprometer a qualidade dos frangos de corte ao abate.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A.P.; NASCIMENTO, E.R.; DANELLI, M.G.M.; LIGNON, G.B.; SANTOS, M.A.J.; NASCIMENTO, M.G.P. Relação entre infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* e lesões de sacos aéreos em frangos de corte. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n. 6, p. 257-262, 1998.

ALMEIDA, D. O.; TORTELLY, R.; NASCIMENTO, E.R.; CHAGAS, M.A.; KHAN, M.I.; PEREIRA, V.L.A. Avian infectious bronchitis and deep pectoral myopathy - A case control study. *Poultry Science*, v 91, p.3052-3056, 2012.

ASSIS, M.T.Q.M.; GRUBER, G.L.; HOFMEISTER, A.W.; GUIMARÃES, A.M.P. Avaliação do percentual de descarte na condenação parcial de frangos. *Revista Nacional da Carne*, n. 313, p. 22-31, 2003.

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.

BARCELOS, A.S. *Avaliação Macroscópica, Histopatológica e Bacteriológica de Fígados de Frangos (Gallus gallus) Condenados no Abate pela Inspeção Sanitária*. Santa Maria, 2005. 83 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

BENCINA, D.D.; DORRER; TADINA T. Mycoplasma species isolated from six avian species. *Avian Pathology*, v. 16, p. 653-664, 1987.

BENTRANO, L.; KLEIN, T. A.P.; JAENISCH, F.R.; BACK, A.; CASTRO, A.G.M. Isolamento do vírus de bronquite infecciosa das aves de surtos da doença associada a lesões atípicas de miopatia de músculo peitoral. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. Campinas: FACTA, p.232, 2005.

BRANTON, S. L.; BEARSON S. M. D. ; BEARSON B. L. ; MASLIN W. R.; COLLIER S. D.; EVANS J. D.; MILES D. M. ; PHARR G. T. *Mycoplasma gallinarum* infection in commercial layers and onset of fatty liver hemorrhagic syndrome. *Avian Diseases*, v. 47, n. 2, p. 458-462, 2003.

BRASIL. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1994. Seção 1, p.13.

BRASIL. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de carne de aves. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1998.

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.

CALLISON, S.A.; HILTON, D.A.; BOYTON, T.O.; SAMPLE, B.P.; ROBISON, R.; SWAYNE, D.E.; JACKWOOD, M.W. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of Virological Methods*, Elsevier, v. 138, p. 60-65, 2006.

CAVANAGH, D. ; GELB JR. Infectious Bronchitis. Seção 1: Viral Diseases, Cap. 4. *Diseases of poultry*. Blackwell Publishing, 12 th, p. 117-136, 2008.

CHARLTON, B.R.; BERMUDEZ, A.J.; BOULIANNE, M.; ECKROADE, R.J.; JEFFREY, J.S.; NEWMAN, L.J.; SANDER, J.E.; WAKENELL, P.S. In: CHARLTON, B.R. *Avian Disease Manual*. USA: American Association of Avian Pathologists, 1996. p.115-25.

CUBILLOS, A. Bronquite infecciosa aviária. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. *Patologia Aviária*. São Paulo: Manole, 2009, p.158-171.

DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...Campinas : FACTA*, 2001, p. 191-203.

DIERKS, R.E., NEWMAN, J.A.; POMEROY, B.S. Characterization of avian mycoplasma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 143, p.170-189, 1967.

DI FÁBIO, J.; BUITRAGO, L.Y.V. Bronquite Infecciosa das Galinhas. In: BERCHIERI Jr. et al. *Doenças das Aves*. Campinas : FACTA, 2009, p. 631-650.

EDWARD, D.C; FREUNDT, E.A. The classification and nomenclature of organisms of pleuropneumonia group. *Journal of General Microbiology*, v. 14, p. 197-207, 1956.

DOVC, P.D; BENCINA, D.D.; ZAJC, I. Genotypic heterogeneity among strains of *Mycoplasma gallinarum*. *Avian Pathology*, v. 20, p. 705-711, 1991.

FEDDE, M.R. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, v. 77, p. 1130-1138, 1998.

FICKEN, M.D. Respiratory system. In: RIDDELL, C. *Avian Histopathology*. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1996. Cap. 6, p. 89-109. 234p.

GAMA, N.M.S. Laringotraqueíte: o caso brasileiro. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, *Anais...Santos : FACTA*, 2004, p. 85-92.

GAMA, N. M. S. Q.; INOUE, A. Y.; BUIM, M. R.; GUASTALLI, E. A. L. Doenças respiratórias. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM AVICULTURA PARA POSTURA COMERCIAL, 2, 2005. Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal, 2005. p. 43-49.

INOUE, A.Y.; CASTRO, A.G.M., Fisiopatologia do sistema respiratório. In: BERCHIERI Jr. et al. *Doenças das Aves*. Campinas : FACTA, 2009, p. 281-302.

JORDAN, P. T. W. Avian Mycoplasmas. In: THE MYCOPLASMAS. *Human and Animal Mycoplasmas*. New York : J. G. Tully, R. P. Whitcomb Academic Press, 1979, v. 2, p. 1-48.

JORDAN, P.T.W.; PATTISON, M. Avian Micoplasmosis. In: _____. *Poultry Diseases*. 4 ed. London: W.B.Sauders Company Ltd. , 1996, 546 p. , cap.11, p. 81- 93.

LAUERMAN, L.H.; HOERR, P.J.; SHARPTON, A.R.; SHAD, S.M.; SANTEN, L.V. Development and application of a Polymerase Chain Reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, v. 37, p. 829-834, 1993.

LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A.; JOHANSEN. Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, v. 39, p. 804-811, 1995.

LEIGH, S.A.; EVANS, J.D. Detection of *Mycoplasma gallinarum* by Real-Time PCR. *Journal of Poultry Science*, v.8, n.2, p. 108-111, 2009.

LIMA, C.E.; MARTINS, T.C.; SOLDADO, G.V.; SILVA, R.S. Caracterização das exportações e da competitividade internacional do complexo de carnes brasileiras. Disponível em: http://www.apec.unesc.net/VI_EEC/sesoes_tematicas/Tema11-Economia%20e%20a%3%A7oes%20Internacionais/Artigo-6-Autoria.pdf. Acesso em 01 de out. 2012.

LEITÃO, M.P.P. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, *Anais...*Campinas : FACTA, 2001, p. 181-190.

LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 13 ed. New York. MacGraw-Hill, 1968, 258p.

KLEVEN, S.H; EIDSON, C.S.; FLETCHER, O.J. Airsacculitis Induced Broilers with a Combination of *Mycoplasma gallinarum* and Respiratory Viruses. *Avian Diseases* , 1978, v. 22, p. 707-716.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: KLEVEN, S.H.; LEY, D.H.; CHIN R.P.; GHAZIKHANIAN G. Y.; KEMPF, I.; FERGUSON-NOEL, N.; BRADBURY, J.M. Seção 2: Bacterial Diseases, Cap. 21. *Diseases of poultry*. Blackwell Publishing, 12 th, p. 805-864, 2008.

MACARI, M.; GIVISIEZ, P.E.N. *Fisiologia respiratória*. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. São Paulo: FACTA. 2 ed., 2002. p.37-49.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Exportação*. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao> >. Acesso em: 09 ago. 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTUSKO, J.M.D.; PARKES, J. *Microbiologia de Brock*, 10 ed., São Paulo, 2004, cap. 10, p. 294-296.

MARTINS, P.C. Surtos de Influenza Aviária: Evolução, Controle e seus reflexos no mercado avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2001, Campinas, SP. *Anais...*Campinas: FACTA. 2001, 2v., V.2, p.97-112.

MENDES, A.A.; PATRICIO, I.S. Controles registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A.A.; Nääs, I.A.; Macari, M. *Produção de Frangos de Corte*. Campinas : FACTA, 2004. 356p. Cap.20, p. 323-335.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v.2, p. 111-117, 2001.

MORENO, A.M. 2009. Técnicas moleculares de diagnóstico. In: REVOLLEDO L.; FERREIRA, A.J.P e organizadores. *Patologia Aviária*. São Paulo: Manole, 2009. 510p. Cap.14, p.413-427.

METTIFOGO, E.; FERREIRA, A. J. P. *Saúde Aviária e Doenças*. In: FILHO, R. L. A. *Micoplasmose aviária*. São Paulo: Editora Roca, 2007. p. 147-151.

MONTASSIER, H.J. Bronquite Infecciosa: Aspectos Relevantes da Doença, da Imunidade e do Controle Disponível em: < http://www.avisite.com.br/cet/img/20101015_bronquite.pdf > Acesso em: 23 nov. 2012.

MORETTI, L.A. *Monitoramento dos registros de condenações na população de frangos abatidos no SIF 2485, no período de 1995 a 2005: avaliação das séries históricas e análise crítica*. São Paulo, 2006. 189 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo: 2006.

NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO R.; HERRICK K.R.; TAIT, R.C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v. 35, p. 62-69, 1991.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI Jr. et al. *Doenças das Aves*. Campinas : FACTA, 2009, p. 485-502.

ORTELAN, C.B. Mercado de frango segue firme em junho. *Avicultura Industrial*, n.7, p. 26-30, 2012

PEREIRA, V.L.A.; NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; SILVA, C.C.; VOLÚ, R.A.; SILVA, R.C.P. *Mycoplasma gallinarum* em poedeiras comerciais com doença respiratória. In: ANAIS DO PRÊMIO LAMA, 2011, Santos. *Anais...Santos*: FACTA, 2011. CD-ROM.

PONTES, A.P. Programa de controle de Salmonella em abatedouros de aves. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola. Santos, *Anais... Santos*: APINCO, 2004, p.102.

POVEDA, J.B.; CARRANZA, J.; MIRANDA, A.; GARRIDO, A.; HERMOSO, M.; FERNANDEZ, A.; DOMENECH, J. An epizootiological study of avian mycoplasmas in southern Spain. *Avian Pathology*, v.19, p. 627-633, 1990.

QUEVEDO, A. Anuário 2005 – Frango à brasileira. Disponível em:<<http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica>> Acesso em: 13 set. 2012.

ROBINSON, T.D.; WILLIAMS, M.H.; HAIG D.A. The isolation and comparative biological and physical characteristics of T-mycoplasmas of cattle. *Journal of General Microbiology*, v. 54, p. 33-46, 1968.

ROBINSON, T.D.; DINTER, Z. Mycoplasma host specificity in the light of strains isolated from pigs. *Journal of General Microbiology*, v. 53, p. 221-229, 1968.

SALISCH, H.; HINZ, K-H; GRAACK, H-D., RYLL, M. A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. *Avian Pathology*, v. 27, p. 142-147, 1998.

SAMBROK, J.; FRITSCH E.P.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap.14, v.2, 1989.

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, 2v., V.1, p.47-91.

SHAD-MAJID, M. Effect of *Mycoplasma gallinarum* on embryonated village chicken eggs. *Research in Veterinary Science*. v. 57, p. 390-392, 1994.

SHAD-MAJID, M. Effect of mixed infection of *Mycoplasma gallinarum* and Newcastle disease virus (F strain) on the tracheal epithelium of village chickens. *Research in Veterinary Science*. v. 61, p. 176-178, 1996.

SILVA, E.N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos, *Anais...Santos* : FACTA, 2004, p. 193-199.

SILVA, E.N. Medidas gerais de controle de salmonelas em frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, *Anais...Santos : FACTA*, 2005, p. 229-237.

SINGH, K.C; UPPAL, P.K. Isolation of *Mycoplasma gallinarum* from sheep. *Veterinary Record*, v. 120, p. 464, 1987.

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

TAYLOR-ROBINSON, D.; CHERRY, J.D. A non-pathogenic mycoplasma inhibiting the effect of a pathogenic mycoplasma in organ culture. *Jornal of Medical Microbiology*, v. 5, p. 291-298, 1971.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose – Conceitos Gerais. In: Revollo L, Ferreira AJP. *Patologia Aviária*. Barueri: Manole; 2009. p. 510.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2012. Disponível em: <<http://www.abep.com.br/ubabef/exibenoticiaubabep.php?notcodigo=3293>>. Acesso em 10 set. 2012.

VARLEY, J.; JORDAN, P.T.W. The response of turkey poults to experimental infection with strains of *M. gallisepticum* of different virulence and with *M. gallinarum*. *Avian Diseases*, v. 7, p. 383-395, 1978.

WAN, X.F; BRANTON, S.L; COLLIER S. D.; EVANS, J.D.; LEIGH, S.A; PHARR, G. T., Proteomics inference of genes involved in host adaptation of *Mycoplasma gallinarum*. *Veterinary Microbiology*, 2010, VETMIC-4819, p. 1-8.

WANG, Y.; WHITHEAR, K.G.; GHIOCAS, E., Isolation of *M. gallinarum* and *M. gallinaceum* from the reproductive tract of hens. *Australian Veterinary Journal*, v. 67 p.31-32, 1990.