

Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* em oviduto de galinhas SPF - Relato de caso*

Leandro dos Santos Machado¹⁺, Felipe Faccini dos Santos¹, Lídia Maria Marques dos Santos¹, Mariza Dinah Manes Brandão¹, Raquel Gouvêa¹, Dayse Lima da Costa Abreu², Virginia Léo de Almeida Pereira² e Elmiro Rosendo do Nascimento²

ABSTRACT. Machado L.S., Santos F.F., Santos L.M.M., Brandão M.D.M., Abreu D.L.C., Gouvêa R., Pereira V.L.A. & Nascimento E.R. [**Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in oviduct of SPF hens - Case report.**] Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* em oviduto de galinhas SPF - Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(1):45-48, 2016. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Bairro Icaraí, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: leomachadovet@gmail.com

Mycoplasma gallisepticum (MG) has horizontal transmission, by direct contact with respiratory secretions, or vertical. Serological tests such Serum Agglutination Reaction (SAR), ELISA and PCR detection by agent are among the analyzes recommended by government programs for monitoring mycoplasmosis in poultry. This study used 40 Leghorn chickens "Specific Pathogen Free" housed in farm with historically positive by MG. The chickens were monitored monthly by SAR, ELISA, from the serum of birds and PCR from tracheal swabs. At 33 weeks old, four birds were randomly selected for analyze in the necropsy. Fragments were analyzed from different parts of the oviduct (infundibulum, magnum and isthmus) by PCR. All chickens were negative for MG to the SAR, the ELISA and PCR to 33th week of age. In the PCR, the four samples of oviduct, three were positive in the infundibulum; two in the magnum; two on the isthmus; all chickens infected with at least a portion of the oviduct. MG infection was diagnosed by PCR from the oviduct of birds which were negative by conventional monitoring techniques, prior to seroconversion by PCR and trachea swabs. Hens negative for MG using PCR from tracheal swabs and serological tests showed positive PCR results for oviduct samples.

KEY WORDS. *Mycoplasma gallisepticum*, layers, oviduct, PCR, sorology.

RESUMO. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) possui transmissão horizontal, mediante o contato direto com secreções respiratórias, ou vertical. Testes sorológicos como a Soroaglutinação Rápida (SAR) e ELISA e a detecção do agente por PCR estão entre as análises recomendadas por programas governamentais para o monitoramento de micoplasmoses em aves. Neste estudo foram utilizadas 40 galinhas Leghorn "Specific Pathogen Free" alojadas em instalações historicamente positivas para MG. As ga-

linhas foram monitoradas mensalmente por SAR, ELISA, a partir do soro das aves e PCR, a partir de suabes traqueais. Na 33ª semana de idade, quatro aves foram selecionadas aleatoriamente para avaliação à necropsia. Foram analisados fragmentos de diferentes partes do oviduto (infundíbulo, magno e do istmo) por PCR. Todas as galinhas foram negativas para MG à SAR, ao ELISA e à PCR até 33ª semana de idade. À PCR, das quatro amostras de oviduto, três, foram positivas no infundíbulo; duas

*Recebido em 10 de junho de 2015.

Aceito para publicação em 21 de dezembro de 2015.

¹ Médico-veterinário. Laboratório de Sanidade Avícola, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Bairro Icaraí, Niterói, RJ 24230-340. *Autor para correspondência, E-mail: leandromachadovet@yahoo.com.br

² Médico-veterinário. Professor. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Bairro Icaraí, Niterói, RJ 24230-340.

no magno; duas no istmo; sendo todas as galinhas infectadas em pelo menos uma parte do oviduto. Galinhas negativas para MG utilizando PCR em esfregaços de traqueia e testes sorológicos mostraram resultados positivos da PCR para amostras do oviduto.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycoplasma gallisepticum*, poedeiras, oviduto, PCR, sorologia.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma gallisepticum (MG) destaca-se como um patógeno de preocupação para a indústria avícola e pode causar doenças subclínicas ou aparentes em galinhas, perus e em outras aves. As manifestações clínicas de MG são tosse, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, retardo de crescimento, lotes desiguais, queda na produção de ovos e mortalidade variável (Nascimento & Pereira 2009). A transmissão de MG pode ocorrer de forma horizontal mediante o contato direto com secreções respiratórias ou verticalmente pelo oviduto. A transmissão vertical é, portanto, uma das principais razões da dificuldade em controlar e erradicar a doença (Cerdá 2007).

O diagnóstico epidemiológico pode ser realizado por monitoramento sorológico e/ou etiológico, seguindo procedimentos epidemiológicos de amostragem e periodicidade específicos. Os testes sorológicos recomendados pelo programa governamental de saúde de aves para o monitoramento das micoplasmoses são Soroaglutinação rápida (SAR), Inibição da Hemaglutinação (HI) e ELISA, porque são baratos e de simples execução (Brasil 2001). Entretanto, nos testes sorológicos há possibilidade de haver reações cruzadas entre as espécies de micoplasma e reações não específicas. A utilização de vacinas atenuadas e antimicrobianos pode interferir no diagnóstico, sendo, portanto necessária a confirmação por PCR e/ou isolamento (Nascimento et al. 2005a). A PCR pode tanto detectar, quanto tipificar o agente, sem a necessidade de um cultivo prévio. Entre as vantagens do diagnóstico molecular, é possível citar a rapidez, a especificidade, detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos e a detecção antes da indução de uma resposta imunológica e em hospedeiros imunocomprometidos, demonstrando vantagens sobre os testes sorológicos (Moreno 2009). A citoadescrição de MG, fator essencial no sucesso da colonização, é destacada nas superfícies epiteliais do trato respiratório sendo também já observado em órgão reprodutor (Papazisi et al. 2002). De acor-

do com isso, apesar de vários estudos utilizarem a traqueia como órgão de eleição para o diagnóstico micoplasmológico, outros órgãos também podem ser utilizados (Buim et al. 2009; Srinivasan et al. 2014). Este estudo teve como objetivo a utilização de amostras de ovidutos de galinhas SPF, alojadas em granja sabidamente positiva para MG, na detecção desse agente pela PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Em uma granja apresentando histórico de aves infectadas e não vacinadas por MG no município de Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil, foram monitoradas 40 poedeiras "Specific Pathogen Free" (SPF), alojadas com um dia de idade em ambiente fechado, telado com malha fina e anteriormente limpo e desinfetado. As aves foram testadas durante a primeira semana de vida para confirmar que eram livres de MG e/ou MS. Foi realizado o exame clínico das aves, e foram coletadas amostras de sangue, de todas as aves, para obtenção de soro na 8^a, 11^a, 15^a, 18^a, 20^a, 24^a, 27^a, 30^a e 33^a semanas para realização de SAR e ELISA. Foi feita a coleta de aproximadamente 2,0 mL de sangue, pela veia braquial das aves de cada grupo, e o soro foi submetido à SAR contra antígenos comerciais de MG (Biovet, SP, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante e ELISA, utilizando *M. gallisepticum* Antibody Test Kit (IDEXX, SP, Brasil).

Na 33^a semana de idade, quatro galinhas foram submetidas à eutanásia por desarticulação atlanto-occipital e necropsiadas para a coleta de suabes de traqueia e fragmentos de três porções do oviduto (infundíbulo, magno e istmo), acondicionados em Meio de Frey líquido sob refrigeração para detecção de MG pela PCR.

Os fragmentos de oviduto foram submetidos à maceração mecânica. Uma alíquota de 1 ml de meio Frey utilizado nos suabes traqueias da 8^a, 11^a, 15^a, 18^a, 20^a, 24^a, 27^a, 30^a e 33^a semanas e nas amostras das diferentes porções do oviduto da 33^a semana, foram encaminhadas para extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio, adaptado de SAMBROOK et al. (1989). Foram utilizados *primers* específicos para MG cepa de campo (5'-CGT GGA TAT CTT TAG TTC" CAG CTG C - 3' e 5'-GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T - 3'), de acordo com Nascimento et al. (2005b) e para cepa vacinal MG-F (Ceva Animal Health, São Paulo, SP, Brasil) (5'-CGT GGA TAT CTT TTC TAG CAG CTG GCA C-3' e 5'-GTA AGT TAT CAG GCA AAT TTC T-3'), conforme Nascimento et al. (1993). A reação para a PCR conteve: 56 µL de água ultrapura (Milli-Q), 10,0 µL de Tampão PCR 10X, 8,0 µL de MgCl₂ (25mM), 5,0 µL de dNTP mix (0,25 mM de cada), 2,0 µL de cada "primer" (100pmol), 2 µL de Taq Polimerase (2,5U/µL) e 15 µL do DNA extraído e ressuspenso em tampão TE, obtendo-se um volume final de 100 µL. A PCR foi realizada seguindo nas seguintes condições: 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto e alongamento a 72°C por dois minutos, com uma fase final de extensão de 72°C por 10 minutos. O resultado da amplificação foi

obtido por corrida eletroforética das amostras em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e a visualização sob luz ultra-violeta em transiluminador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas aves positivas para *Mycoplasma gallisepticum* pelas técnicas sorológicas (SAR E ELISA) e à PCR, a partir de suabes de traquéias até a 33ª semana de idade. Nunoya et al. (1997) descreveram salpingite por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) em poedeiras, queda na produção de ovos e constatou a presença de MG através de ELISA com anticorpos específicos e pela sua observação sobre a superfície epitelial ao se utilizar microscopia eletrônica e imuno-histoquímica. Neste estudo ao contrário do descrito por Nunoya et al. (1997) não foram observadas alterações nos níveis de anticorpos para MG ao ELISA, provavelmente porque o agente possui um escape do sistema imunológico do hospedeiro e se adapta a diversas fases de infecção do organismo do hospedeiro, segundo Levisohn et al. (1995).

Em relação aos resultados de PCR, após a corrida eletroforética e incidência de luz ultravioleta em transiluminador, foram observados amplicons de 481 pares de base (pb) caracterizou a positividade para cepa selvagem de MG nas amostras de oviduto. Não foram observados amplicons de 524 pb, característicos da cepa vacinal MG-F, em todas as amostras analisadas, Foram positivas três de quatro amostras positivas de infundíbulo, duas de magno e duas de istmo (Tabela 1), sendo todas as galinhas infectadas em pelo menos uma porção do oviduto. O impacto sobre oviduto por MG é relatado no estudo de Srinivasan et al. (2014) que analisando 255 lotes de poedeiras no período de 2006-2009 na Índia, observou por análise sorológica de ELISA que MG estava presente em 10 lotes. Pruthi & kharole (1981) estudando pintos da raça Leghorn branca, nascidos de ovos pré-tratados com eritromicina inoculou MG através do saco vitelino e descreveu

alterações macroscópicas e microscópicas em um segmento ou em todo o comprimento do oviduto, demonstrando a capacidade de MG em colonizar o aparelho reprodutor feminino como se pode observar em nosso estudo. Ferguson-noel et al. (2012) ao analisar aves vacinadas e não vacinadas desafiadas com uma estirpe virulenta de MG, descreveram regressão do ovário e edema leve e infiltrado linfocitário focal na mucosa do magno.

CONCLUSÃO

Esses resultados reforçam o risco de disseminação e transmissão vertical de MG e a importância do uso de métodos moleculares como a PCR para se monitorar a descontaminação de granjas antes da introdução de novas aves. De acordo com este estudo além de amostras do sistema respiratório, seria importante a coleta de regiões do oviduto para o monitoramento. A presença de MG em oviduto comprova que o agente possui tropismo pelas suas mucosas nas diferentes porções. Estudos futuros utilizando os folículos ovarianos também seriam de grande valia para o entendimento da patogenicidade do MG, já que estes estão em contato direto com os sacos aéreos abdominais, órgão sabidamente afetado por esse agente.

Agradecimentos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Comitê de ética e biossegurança. O experimento foi autorizado com o número 155 do Comitê de Ética Animal, da Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, Brazil.

REFERÊNCIAS

- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). Diário Oficial da União. Brasília, DF, p.68-70, de 24 de agosto de 2001, Seção I. BRASIL.
- 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. *Pesq. Vet. Bras.*, 29:552-556, 2009.
- Cerdá R.O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica, p.111-124. In: Anais 20º Congreso Latinoamericano de Avicultura. Centro de Eventos Fingers, Porto Alegre, 2007.
- Ferguson-noel N., Cookson K., Laibinis V.A. & Kleven S.H. The Efficacy of Three Commercial *Mycoplasma gallisepticum* Vaccines in Laying Hens. *Avian Diseases*, 56:272-275, 2012.
- Levisohn S., Rosengarten R. & Yogev D. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Vet. Microbiol.*, 45:219-231, 1995.
- Moreno A.M. Técnicas moleculares de diagnóstico, p.413-427. In: Re-

Tabela 1. Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) à PCR a partir de amostras de diferentes porções do oviduto de galinhas SPF.

Porções do oviduto	PCR MG			PCR MG-F*		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total de aves
Infundíbulo	03/04	01/04	04/04	00/04	04/04	04/04
Magno	02/04	02/04	04/04	00/04	04/04	04/04
Istmo	02/04	02/04	04/04	00/04	04/04	04/04

* Cepa vacinal MG-F.

- volledo L. & Ferreira A.J.P. (Eds), *Patologia Aviária*. Editora Manole Ltda., Barueri, 2009.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. Micoplasmoses, p.485-500. In: Di Fabio J. & Rossini L.I. (Eds), *Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, 2009.
- Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Nascimento M.G.F. & Barreto M.L. Avian Mycoplasmosis Update. *Ver. Bras. Ciên. Avícola*, 7:01-09, 2005a.
- 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 ajuste no processamento da amostra. *Acta Sci. Vet.*, 33:297-301, 2005b.
- Nascimento E.R., Yamamoto R., Herrick K.R. & Tait R.C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 35:61-69, 1991.
- Nunoya T., Kanai K., Yagihashi T., Hoshi S., Shibuya K. & Tajima M. Natural case of salpingitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Pathol.*, 26:391-398, 1997.
- Papazisi L., Frasca Jr S., Gladd M., Liao X., Yogev D. & Geary S.J. GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infection and Immunity*, 70:6839-6845, 2002.
- Pruthi A.K. & Kharole M.U. Sequential Pathology of Genital Tract in Chickens Experimentally Infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 25:768-778, 1981.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Srinivasan P., Balasubramaniam G.A., Murthy T.R.G.K. & Balachandran P. Prevalence and pathology of oviduct impaction in commercial white leghorn layer chicken in Namakkal region of India. *Vet. World*, 7:553-558, 2014.