

# Qualidade de frangos de corte infectados com *Mycoplasma gallinarum* isoladamente ou em combinação com o vírus vacinal da Bronquite Infecciosa das Galinhas\*

Cátia Cardoso da Silva<sup>1+</sup>, Felipe Faccini dos Santos<sup>2</sup>, Thiago Silva Faria<sup>2</sup>, Daniela Sabroza José<sup>3</sup>, Rogério Tortelly<sup>4</sup>, Dayse Lima da Costa Abreu<sup>5</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>6</sup>, Leandro dos Santos Machado<sup>7</sup>, Mariane Verinaud Soares<sup>8</sup> e Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** da Silva C.C., dos Santos F.F., Faria T.S., José D.S., Tortelly R., Abreu D.L. da C., do Nascimento E.R., Machado L. dos S., Soares M.V. & Pereira V.L.A. [Quality of broilers infected with autochthonous MGA strain, alone or in combination with Infectious Bronchitis Virus (IBV) vaccine.] Qualidade de frangos de corte infectados com *Mycoplasma gallinarum* isoladamente ou em combinação com o vírus vacinal da Bronquite Infecciosa das Galinhas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(4):420-430, 2016. Departamento de Saúde Coletiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: catinha\_cardoso@hotmail.com

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, at the same time the pronounced production increased the risk of spreading respiratory diseases, such as avian mycoplasmosis and Infectious Bronchitis. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Mycoplasma meleagridis* (MM) are recognized as indisputable pathogens for the poultry industry, however *Mycoplasma gallinarum* (MGA) has been considered commensal. The aim of this study was to evaluate the quality of broilers infected with autochthonous MGA strain, alone or in combination with Infectious Bronchitis Virus (IBV) vaccine. There were raised 96 broiler chicks since one-day-old, Cobb line, mycoplasma free. They were separated in four groups of 24 birds 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<sup>®</sup>, Biovet, SP); Group 4 (G4), infected with MGA and vaccinated with commercial IBV. The infection was monitored by MGA PCR and IBV vaccination was confirmed by RT-PCR. The feed intake record was made for the pe-

---

\*Recebido em 24 de janeiro de 2016.

Aceito para publicação em 28 de abril de 2016.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPMV), Faculdade Veterinária (FV), Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. +Autora para correspondência, E-mail: catinha\_cardoso@hotmail.com

<sup>2</sup> Médico-veterinário, PPMV, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mails: felipefaccini@hotmail.com; tsfvet@gmail.com

<sup>3</sup> Médica-veterinária, PPMV, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: danisabroza@gmail.com

<sup>4</sup> Médico-veterinário, DSc. Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: rtortelly@hotmail.com

<sup>5</sup> Médica-veterinária, DSc. Departamento de Saúde Coletiva, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mails: dayseabreu@id.uff.br; virginialeo@id.uff.br

<sup>6</sup> Médico-veterinário, PhD. Departamento de Saúde Coletiva, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: elmirorosendo@id.uff.br

<sup>7</sup> Médico-veterinário, DSc. Departamento de Saúde Coletiva, FV, UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: leomachadovet@gmail.com

<sup>8</sup> Médica -veterinária, LPD Aves e Suínos, IDEXX Brasil Laboratórios, Av. Brig. Faria Lima 4300, 1º andar, São Paulo, SP 04538-133. Email: mariane-soares@idexx.com

riod of the experiment. Weekly, four broilers were randomly taken from each group, individually weighed and submitted for blood sampling and the necropsy for obtaining samples for laboratory analysis. It was collected fragments of trachea, lungs, air sacs, liver, heart, chest muscles, kidneys and digestive tract, fixed in 10% formalin for histopathology. Tracheas scraping samples 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, obtained from blood, were subjected to ELISA for MG, MS and IBV. Weight gain was calculated by weight mean divided for the number of days old of the birds. Feed intake between the groups was similar up to 42 days. 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 35<sup>th</sup> day of age) and G4 (at the 14<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, and 42<sup>sd</sup> 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 seventh and 42<sup>sd</sup> days old) and G4 (seventh, 14<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup> and 42<sup>sd</sup> days old). By ELISA, all groups were negative for MG and MS and for IBV, had titles in the first, credited to maternal antibodies, which decreased with seven days and were negative with 14 days of age in all groups. By necropsy, observed lesions were not noteworthy in G1 and G3. In the other groups it was observed ascitis, catarrhal exudate in the trachea, airsacculitis, hydropericardium, pneumonia, synovitis, and pectoral myopathy in variable number of birds between groups and according to age groups. The differences in the frequencies of macroscopic lesions among the groups were significant (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ). By histopathology, in G2 was observed pneumonia with multiple nodules characteristic peribronchial lymphoid and diameters variables and in G4, was observed vacuolar muscle degeneration accompanied by muscle atrophy and necrosis of the breast, also inflammation associated with focal necrosis in the lung. The MGA alone was not capable of causing apparent disease in broilers infected, although produced pulmonary lesions in the final stage of creation but when associated with BIG vaccine caused lesions amenable to condemnation that may compromise the quality of broilers at slaughter.

KEY WORDS. Mycoplasmas, broiler, histopathology.

**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 biosseguridade 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 *Mycoplasma 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 observadas 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.

## 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 biossegurança 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, Sinosite 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).

*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.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

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. 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-Bronk-vet®, 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 ( $2 \times 10^8$  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.

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 & 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.

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 ob-

tenção 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 a -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.

Para o isolamento de micoplasmas, as amostras foram diluídas até  $10^5$  em meio de Frey modificado 200 µl 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.

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.

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 centrifuga refrigerada (Thermo Electron Corporation PK121R). O sobrenadante de cada microtubo foi descartado e utilizou-se o sedimento de 40 µL que foi adicionado de 400 µl de tampão Tris-ETA dextrose, 30 µl de solução aquosa de Proteinase K e 30 µl 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 µl de fenol e homogeneizadas por inversão por 15 minutos. Depois foram centrifugadas por 30 minutos, a 13.500 rpm (18403X G),

a 10°C. Na sequência, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 500 µl 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 (18403 XG) a 10°C e o álcool foi descartado. Após a secagem dos microtubos, o sedimento foi ressuspenso em 100 µl de tampão Tris-ETA (TE), pH 7,6 e estocados no freezer a -20°C até a utilização na PCR.

Foram utilizados *primers* específicos de micoplasmas, amostras padrões de MG (ATCC 19610), MS (WVU 1853) e MGA (GM67StrainPG16) foram utilizadas como controles positivos. A PCR foi preparada em microtubo que continha: 61,5µL de água Mili-Q; 10µl de tampão PCR 10X; 4µl de MgCl<sub>2</sub> (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.

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.

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup> 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 (18403 x G) 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.

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 Quick<sup>™</sup> 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 Quick<sup>™</sup>*, 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 Corporation 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.

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<sup>®</sup> (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 absorvância com comprimento de onda de 650 nm - A(650).

Tabela 1. Frangos de corte. 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)	Grupos <sup>a</sup>								Padrão COBB	
	G1		G2		G3		G4		Peso (g)	GPD (g)
	Peso (g)	GPD (g)	Peso (g)	GPD (g)	Peso (g)	GPD (g)	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

<sup>a</sup>Peso e GPD= ganho de peso diário em gramas; NR= Não realizado; não vacinados e nem infectados (G1); *Mycoplasma gallinarum* - MGA (G2); Bronquite Infecçiosa das Galinhas - BIG (G3); e infectados com MGA e vacinados contra BIG (G4)

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 média 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:  $\text{Log}_{10}^{\text{título}} = 1,09 \times (\text{Log}_{10}^{S/P}) + 3,36$

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.

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.

## 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.

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 14º 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 1) 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 2).

No G3 foi também não foram observadas lesões relevantes.



Figura 1. Ascite observada no grupo infectado com MGA (G2) aos 21 dias de idade



Figura 3. Sinovite observada no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 28 dias de idade



Figura 4. Miopatia peitoral observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade

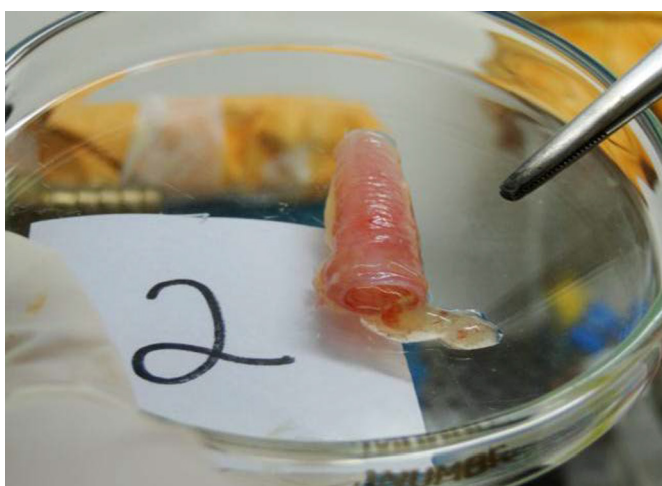


Figura 2. Traqueia com exsudato catarral observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade

Em G4, no 28º dia de idade foi observada sinovite (Figura 3) 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 4), rim aumentado e aerossaculite (Figura 5).

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).

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 (Figuras 6A e 6B). E em G4, foi descrita no pulmão reação inflamatória focal associada à múltiplas áreas de necrose bronquiolar (Figuras 7A e 7B) 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 8). Em corte transversal a fibra apre-



Figura 5. Aerossaculite e pneumonia observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade

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)	Lesões					Total
		Ascite	Exsudato traqueal	Aerossaculite	Pneumonia	Músculo verde	
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
	Subtotal	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
	Subtotal	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
	Subtotal	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
	Subtotal	0/24	2/24	1/24	6/24	1/24	10/24
Total		01/24	3/24	1/24	8/24	1/24	14/96

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

sentava vacúolos pequenos isolados ora múltiplos de pequeno diâmetro, acentuada destruição muscular com granulação basofílica, focos de calcificação e infiltrados heterofílicos.

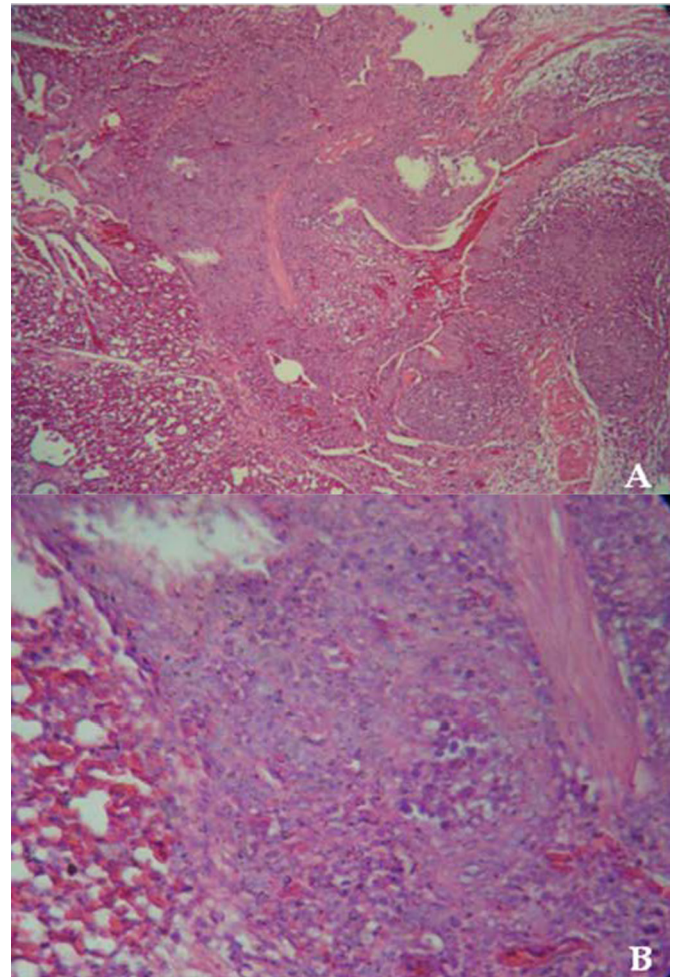


Figura 6. Frango de corte. Nódulos múltiplos peribronquial de característica linfóide e diâmetros variados. Observado no grupo infectado com MGA (G2) aos 42 dias de idade. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X. H.E.

## 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



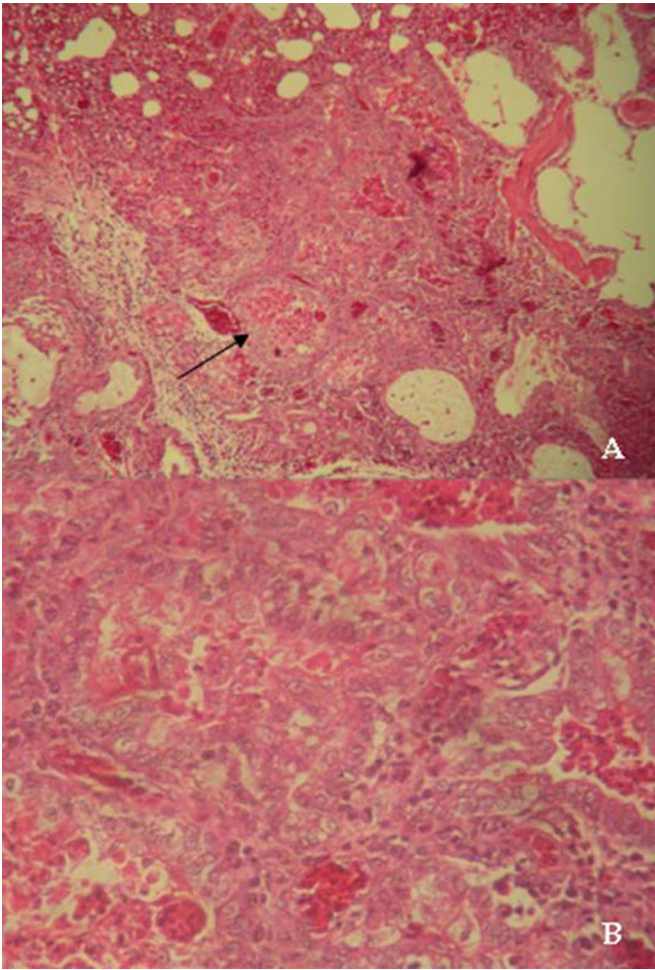


Figura 7. Frango de corte. Broncopneumonia focal. Múltiplas áreas de necrose bronquiolar (SETA) observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. A. 100X. B. Detalhe da figura anterior. 400X. H.E.

com um dia de idade, o que provavelmente se deveu à presença de anticorpos maternos. 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 alvas, tornando a detecção mais difícil. Os micoplasmas podem ativar as células do sistema imune, induzindo imu-

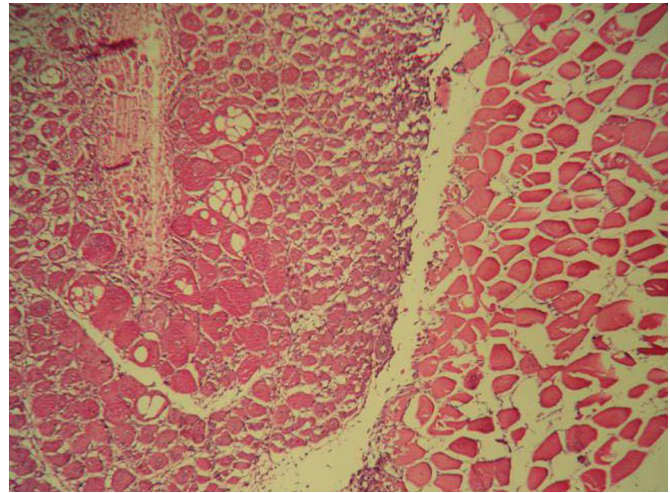


Figura 8. Frango de corte. Miopatia peitoral. Miodegeneração vacuolar acompanhada de atrofia e necrose muscular observado no grupo infectado com MGA e vacinado contra BIG (G4) aos 42 dias de idade. H.E. 100X

nossupressão 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 combina-

da 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. 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 & 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 *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.

## CONCLUSÕES

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.

**Agradecimentos.** À FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- 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 Medicina Veterinária*, 20:257-262, 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*, 91:3052-3056, 2012.
- 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 Ciência Avícola*, Supl 7:232, 2005.
- 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.
- Brasil. Portaria n.º 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.
- Cavanagh D. & Gelb Jr. J. Infectious bronchitis, p.117-135. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E. (Eds), *Diseases of poultry*. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Iowa, 2008.
- Gama N.M.S. Laringotraqueíte: o caso brasileiro, p.85-92. In: *Anais da Conferência Apinco 2004 de Ciência e Tecnologia Avícolas*. FACTA, Santos, 2004.
- Kleven S.H., Eidson C.S. & Fletcher O.J. Airsacculitis induced broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. *Avian Diseases*, 22:707-716, 1978.
- Kleven S.H. Mycoplasmosis, p.805-864. In: Kleven S.H., Ley D.H., Chin R.P., Ghazikhanian G.Y., Kempf I., Ferguson-Noel N. & Bradbury J.M. (Eds), *Diseases of poultry* 12<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, 2008.
- Lauerma L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M. & Santen V.L. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 37:829-834, 1993.
- Lauerma L.H., Chilina A.R., Closser J.A. & Johansen D. Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, 39:804-811, 1995.
- Luna L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 13<sup>rd</sup> ed. New York, MacGraw-Hill, 1968. 258p.
- Mendes A.A. & Patricio I.S. Controles registros e avaliação do desempenho de frangos de corte, p.323-335. In: Mendes A.A., Nääs I.A. & Macari M. (Eds), *Produção de Frangos de Corte*. FACTA, Campinas, 2004.

- 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*, 2:111-117, 2001.
- Nascimento E.R., Yamamoto R., Herrick K.R. & Tait R.C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 35:62-69, 1991.
- Nascimento E.R., Pereira V.L.A. Micoplasmoses, p.485-502. In: Berchieri Jr A., Silva E.N., Di Fábio J., Sesti L. & Zuanaze M.A.F. (Eds), *Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, 2009.
- 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*, 27:142-147, 1998.
- Sambrook K.J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1989, p.3-15.
- 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*, 61:176-178, 1996.
- Stipkovits L. & Kempf I. Mycoplasmoses in poultry. *Review Scientific and Technical OIE*, 15:1495-525, 1996.
- UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2012. (Capturado em: <http://www.abep.com.br/ubabef/exibenoticiaubabep.php?notcodigo=3293>)