

Mycoplasma gallinarum em galinhas poedeiras com doença respiratória*

Cátia Cardoso da Silva¹, Mariza Dinah Manes Brandão¹, Elmiro Rosendo do Nascimento², Juliana Ferreira de Almeida³, Dayse Lima da Costa Abreu³, Maria Lúcia Barreto³, Mariane Verinaud Soares⁴, Leandro dos Santos Machado³ e Virginia Léo de Almeida Pereira³

ABSTRACT. Silva C.C., Brandão M.D.M., Nascimento E.R., Almeida J.F., Abreu D.L.C., Barreto M.L., Soares M.V., Machado L.S. & Pereira V.L.A. [*Mycoplasma gallinarum* in laying hens with respiratory disease.] *Mycoplasma gallinarum* em galinhas poedeiras com doença respiratória. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(4):347-350, 2014. Curso de Pós-Graduação de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 25230-340, Brasil. E-mail: catinha_cardoso@hotmail.com

Mycoplasma gallisepticum (MG), *M. synoviae* (MS) and *M. meleagridis* (MM) are recognized as pathogens of indisputable concern for the Poultry Industry. These species of mycoplasmas are often related to apparent or subclinical infection, causing acute or chronic disease in hens, turkeys and other birds. *M. gallinarum* has been considered a commensal microorganism. This case report describes the diagnosis *M. gallinarum* in an outbreak of respiratory disease in laying hens. It was analyzed a total of 25 birds from four flocks in two farms from Rio de Janeiro state, Brazil. The hens showed a similar clinical picture, with respiratory signs, increased mortality and decreased egg production. Necropsies were performed in some birds after euthanasia by atlanto-occipital dislocation. Gross lesions of conjunctivitis, tracheitis, aerossacculitis, perihepatitis and peritonitis were observed. In two of the flocks, the hens had also cyanosis and hepatic lesions. Tracheal swabs were collected, for PCR and isolation of mycoplasmas. For PCR, DNA extraction was done by phenol/chloroform method and generic primers for *Mycoplasma* spp. and specific primers for MG, MS and *M. gallinarum* were used. A total of 25 isolates positive for *Mycoplasma* spp. and negative for MG and MS were subjected to growth in liquid and solid Frey's media and seven were typing by immunoperoxidase as *M. gallinarum*. These isolates were confirmed as *M. gallinarum* by PCR specific. The absence of MG and MS and the detection of *M. gallinarum* in hens studied, suggested that the clinical manifestations and the lesions observed, could be related to this agent. Consequently, further evaluate of this *M. gallinarum* strain pathogenicity is needed.

KEY WORDS. *Mycoplasma gallinarum*, hen, mycoplasmas, aerossacculitis.

RESUMO. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *M. meleagridis* (MM) são reconhecidos como patógenos de interesse indiscutível para a in-

dústria avícola. Estas espécies de micoplasmas estão muitas vezes relacionadas à infecção aparente ou subclínica, causando doença aguda ou crônica

*Recebido em 16 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 7 de fevereiro de 2014.

¹ Médica-veterinária, MSc, Faculdade de Veterinária, (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 25230-340, Brasil. E-mail: dinah.84vet@yahoo.com.br; *Autora para correspondência, catinha_cardoso@hotmail.com

² Médico-veterinário, PhD, Faculdade de Veterinária, (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 25230-340. E-mail: elmiro@vm.uff.br

³ Médica-veterinária, DSc, Faculdade de Veterinária, (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 25230-340. E-mail: jufalmeida@hotmail.com; dayseabreu@id.uff.br; mlbarreto@gmail.com; leomachadovet@gmail.com; virginialeo@id.uff.br

⁴ Médica-veterinária, Faculdade de Veterinária, (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 25230-340. E-mail: mverinaudvet@gmail.com

em galinhas, perus e outras aves. *M. gallinarum* tem sido considerado um microrganismo comensal. Este relato de caso descreve o diagnóstico *M. gallinarum* em um surto de doença respiratória em galinhas poedeiras. Um total de 25 aves de quatro lotes em duas granjas do Rio de Janeiro, Brasil foi analisado. As galinhas apresentavam um quadro clínico semelhante, com sinais respiratórios, aumento da mortalidade e diminuição da produção de ovos. Foram necropsiadas algumas galinhas, após eutanásia por deslocamento atlanto-occipital. Foram observadas lesões macroscópicas de conjuntivite, traqueíte, aerossaculite perihepatite e peritonite. Em dois dos lotes, as galinhas também tinham cianose e lesões hepáticas. Suabes de traquéia foram coletados para PCR e isolamento de micoplasmas. Para a PCR, a extração de DNA foi realizada pelo método de fenol / clorofórmio e utilizados *primers* genéricos para *Mycoplasma* spp. e específicos para o MG, MS e *M. gallinarum*. Um total de 25 isolados positivos para *Mycoplasma* spp. e negativo para MG e MS foi submetido ao crescimento em meios líquidos e sólidos Frey e sete foram tipificados por imunoperoxidase como *M. gallinarum*. Estes isolados foram confirmados como *M. gallinarum* por PCR específico. A ausência de MG e MS e a detecção de *M. gallinarum* nas galinhas estudadas sugere que as manifestações clínicas e as lesões observadas, podem estar relacionadas com este agente. Por conseguinte, a avaliação suplementar da patogenicidade desta cepa de *M. gallinarum* é necessária.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycoplasma gallinarum*, galinhas, micoplasmas, aerossaculite.

INTRODUÇÃO

O gênero *Mycoplasma* compreende os eucariotos que, pela ausência de parede celular, são enquadrados na classe *Mollicutes* [*Mollis*: mole; *cutis*: pele] (Rosenbusch 1994). Algumas espécies são patogênicas primárias, outras são comensais, mas a maioria é não patogênica e podem ser encontradas em diferentes sítios, mesmo em indivíduos sadios (Timenetsky 2009). Estes microorganismos podem acometer diversas espécies animais, desde insetos até seres humanos.

Em aves, as infecções micoplásmicas têm sido reconhecidas pelas formas clássicas de enfermidades conhecidas como 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), *M. synoviae* (MS) e *M. meleagridis*

(MM). Estes agentes são reconhecidos 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 (Yoder Jr. 1991, Kleven 2003).

As perdas econômicas atribuídas às micoplasmoses por MG, MS e MM são devidas à queda na produção e qualidade dos ovos, à má eclodibilidade (alta mortalidade embrionária), alta taxa de pintos refugos, à queda na eficiência alimentar, às altas taxas de mortalidade e condenação de carcaças e ao alto custo da medicação (Carpenter et al. 1981, Yoder Jr. 1991, Balém et al. 1992, Kleven 2003). As outras espécies de micoplasmas não são comumente relacionadas às doenças em aves e aos consequentes prejuízos econômicos da micoplasmose.

A aparente falta de patogenicidade do *M. gallinarum* tem sido aceita e esta espécie é frequentemente isolada do trato respiratório de frangos de todas as idades (Jordan 1979). Kleven et al. (1978) investigaram pela primeira vez o potencial de patogenicidade do *M. gallinarum* em combinação com vírus respiratórios patogênicos incluindo o vírus da Doença de Newcastle e o vírus da Bronquite Infecciosa. Os resultados revelaram que os frangos desenvolveram aerossaculites devido à inoculação do *M. gallinarum* em combinação com a exposição supraconjuntival ao vírus da Bronquite Infecciosa ou a combinação com vacinas contra Newcastle e Bronquite Infecciosa.

Este relato de caso visa de descrever o diagnóstico de *M. gallinarum* em um surto de doença respiratória em poedeiras comerciais.

HISTÓRICO

Foram analisados quatro lotes de poedeiras comerciais que apresentavam sinais clínicos respiratórios, em duas granjas no Estado do Rio de Janeiro. Com histórico de aumento de mortalidade desde a recria e queda na postura, algumas aves apresentavam crista cianótica e estavam apáticas. Os lotes haviam sido vacinados contra Doença de Marek, Boubá Aviária, Bronquite Infecciosa, Doença de Gumboro, Doença de Newcastle, Coriza Infecciosa, Síndrome da Cabeça Inchada ("Sowollwn Head Syndrome"-SHS), Encefalomielite e Síndrome da Queda de Postura ("Egg Drop Syndrome"-EDS).

Cinco aves de cada lote foram examinadas clinicamente e, após eutanásia pela desarticulação atlanto-occipital, foi realizada a necropsia. Nos quatro lotes trabalhados, as aves apresentaram um quadro clínico semelhante, com sinais respiratórios tais como sinusite, corrimento nasal e conjuntivite. À necropsia, foram observadas lesões como traqueíte, aerossaculite, perihepatite e, em alguns casos, peritonite. Nas duas das granjas avaliadas, aves de um lote apresentaram também cianose.

nose e à necropsia foram visualizadas lesões hepáticas com fígado amarelado, intestino espessado com mucosa de aspecto atoaçado, serosa de aspecto turvo, mesentério turvo e espessado, conteúdo intestinal alaranjado, presença de vermes da classe Cestoda (*Raillietina* sp.) e Nematoda (*Ascaridia* sp. e *Heterakis* sp.), além de aerossaculite.

Foram coletados suabes de traquéia de cada uma das cinco aves, acondicionados em tubos contendo Meio Frey glicerinado a 50%, e encaminhados sob refrigeração para o Laboratório de Sanidade Avícola e Núcleo de Diagnóstico da Micoplasmose da Universidade Federal Fluminense, onde foram realizados PCR e isolamento para a detecção e identificação de micoplasmas.

De cada amostra em Frey glicerinado, foi retirada uma alíquota de 100µL para a PCR. Foram utilizados *primers* para *Mycoplasma* spp. (5'GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T 3' e 5'TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC3', Kuppeveld et al. 1994) que amplificam 270pb. As amostras positivas para o gênero *Mycoplasma* foram testadas com *primers* específicos para MG (5'CGT GGA TAT CTT TAGT TCCA GCT GC3' e 5'GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T3', Nascimento et al. 2005) e para MS (5'GAC AAG CAA AAT AGT GAT ATC A3' e 5'CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A3', Lauerman et al. 1995) que amplificam, respectivamente, 481pb e 207pb, além de submetidas ao isolamento. A extração de DNA foi realizada pelo método fenol/clorofórmio (Sambrook et al. 1989). A PCR foi feita nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, sendo seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C/ 1 minuto, anelamento a 55°C/ 1 minuto e extensão a 72°C/ 10 minutos, seguindo-se uma extensão final de 72°C/ 10 minutos. As amostras padrões de MS (WVU 1853), MG (ATCC 19610) e MGA (GM67StrainPG16) foram usadas como controles positivos, nas mesmas condições. Cada microtubo para reação continha: 59µL de água Mili-Q; 10µL de tampão PCR 10X; 5µL de cloreto de magnésio (25 mM); 5µL do dNTPmix (10 mM), 2µL (100 pmol) de cada *primer*, 15µL de amostra de DNA e 2µL (2,0 U) de Taq Polimerase, totalizando 100 µL. Os resultados foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta, após corrida eletroforética a 94V, em gel de agarose a 1,5% corado em brometo de etídio e fotodocumentados. Dos 25 suabes de traqueia submetidos a PCR, sete foram positivos para *Mycoplasma* spp. e todos foram negativos para MG e MS.

Para o isolamento, cada amostra foi filtrada com seringa descartável acoplada a um filtro estéril com membrana de 0,45µm. Em seguida, 200µL da amostra filtrada foram semeados em 2,0mL de meio líquido de Frey e em meio sólido, incubados sob microaerofilia a 37°C e foram observados diariamente por até 21 dias. As colônias crescidas em meio sólido foram visualizadas em microscópio estereoscópio a um aumento de 2,5. Foram isoladas colônias típicas em meio Frey sólido após três dias de incubação. No meio líquido, os sete isolados positivos na PCR para *Mycoplasma* spp. hidrolizaram arginina alterando a cor do meio de vermelho para vinho, confirmando que não se tratava de MG, nem de MS, es-

pécies que, sabidamente, alteram a coloração do meio para amarelo por serem fermentadoras de glicose (Tully & Razin 1995).

As colônias em forma de "ovo frito", típicas de micoplasma, obtidas no meio sólido foram submetidas à reação de imunoperoxidase para identificação de *Mycoplasma gallinarum*. As colônias foram marcadas e em seguida foi adicionado 20µL dos anti-soros MG, MS e *M. gallinarum* produzidos em coelho e as placas incubadas a 4°C, overnight. Depois foram adicionados a cada colônia marcada, 20µL de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, sendo as placas incubadas a 37°C por três horas. A seguir foram lavadas com uma solução tampão, constituída de TBS, soro de cavalo e Tween 20. A revelação foi feita em seguida utilizando-se uma solução constituída de metanol, 4-cloro 1- naftol, TBS (solução de Trizma base e NaCl) e peróxido de hidrogênio 30%. As placas foram incubadas por 30 minutos, no escuro, e a temperatura ambiente. A tipificação dos sete isolados pela imunoperoxidase identificou *M. gallinarum* nas duas granjas estudadas. As amostras positivas ao isolamento e tipificadas pela imunoperoxidase foram confirmadas à PCR com *primers* específicos para *M. gallinarum* (5'ATA GCA GTT GGA AAC AAC TAT 3' e 5'AGT TTA CAA CCC ATA GGG CC 3', Lauerman et al. 1993, Lauerman et al. 1995) que amplificam 297pb.

DISCUSSÃO

A observação clínica de doença respiratória nas aves das duas granjas trabalhadas foi confirmada pela presença das lesões macroscópicas à necropsia. Kleven et al. (1978) descreveram aerossaculite em infecções mistas por *M. gallinarum* e vírus vacinais de Bronquite Infecçiosa e/ou da Doença de Newcastle. As galinhas das duas granjas estudadas foram submetidas ao programa vacinal que contemplava a imunização contra doenças respiratórias tais como: Bronquite Infecçiosa, Doença de Newcastle, Síndrome da Cabeça Inchada (SHS), o que pode ter contribuído para a exacerbação das manifestações clínicas.

Foi sugerido que o *M. gallinarum* poderia retardar a ocorrência de Síndrome Hemorrágica e do Fígado Gordo em poedeiras comerciais, o que ocorreu com mais evidência em galinhas infectadas somente com MS (Branton et al. 2003). No presente estudo, em dois dos lotes avaliados, as aves apresentaram cianose e à necropsia, foram visualizadas lesões hepáticas com o fígado apresentando aspecto gorduroso e hemorrágico.

O diagnóstico definitivo da micoplasmose aviária é realizado comumente por isolamento e identificação e PCR (Nascimento & Pereira 2009). Esses métodos são também indicados para o monitoramento em granjas aviárias pelos programas oficiais de controle sanitário (Brasil 2001). No surto de

doença respiratória descrito, esses métodos foram eficientes para a detecção do *M. gallinarum* em detrimen- to de MG e MS. Estas duas espécies de micoplasmas têm sido mais frequentemente associados à micoplasmose em galinhas e à perda econômica na Indústria Avícola, entretanto com o incremen- to de medidas preventivas e vacinação visando o controle destas espécies, outras espécies como o *M. gallinarum*, podem emergir e provocar prejuízos econômicos semelhantes. A micoplasmose, mesmo em baixos níveis de infecção, acarreta grandes per- das, uma vez que doenças respiratórias apresentam significantes custos adicionais pela diminuição da eficiência alimentar, repetição de tratamentos com antibióticos, diminuição na produção de ovos e au- mento das reações vacinais (Nascimento & Pereira 2009).

A ausência de MG e MS e a identificação de *M. gallinarum* em poedeiras comerciais com quadro típico de micoplasmose indicam que as manifes- tações clínicas respiratórias, bem como as lesões observadas podem ser creditadas a este agente, que foi capaz de provocar aumento de mortalida- de e queda na produção de ovos. Por conseguinte, a avaliação suplementar da patogenicidade desta cepa de *M. gallinarum* é necessária.

REFERÊNCIAS

- 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 44:49-56, 1992.
- 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*, 47:458-462, 2003.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 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 (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). *Diário Oficial da União*, Seção 1. Brasília, DF, 24 Ago. 2001.
- Carpenter T.E., Mallinson E.T., Miller K.F., Gentry R.F. & Schwartz L.D. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Diseases*, 25:404-409, 1981.
- Jordan F.T.W. The mycoplasmas, p.1-48. In: Tully J.G. & Razin S. (Eds), *Human and animal mycoplasmas*. Academic Press, New York, 1979.
- 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. Micoplasmosis, p.719-721. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. (Eds), *Diseases of poultry* 11th ed. Iowa State University Press, Ames, 2003.
- Kuppeveld F.J., Johansson K.E., Galama J.M., Kissling J., Bölske G., Logt J.T.M. & Melchers W.J.G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by mycoplasma group specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:149-152, 1994.
- Lauerman 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.
- Lauerman 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.
- 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 processo da amostra. *Acta Sci. Vet.*, 33:297-301, 2005.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. Micoplasmoses, p.485-502. In: Bercieri Jr. & Nacari M. (Eds), *Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, 2009.
- Rosenbusch R.F. Biology and taxonomy of the mycoplasma, p.3-11. In: Whitford H.W., Rosenbusch R.F. & Lauerman L.H. (Eds), *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Iowa State University, Ames, 1994.
- Sambrook K.J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Spring Harbour Laboratory, New York, 3:3-15, 1989.
- Timenetsky J. Micoplasmose - conceitos gerais, p.510. In: Revollo L. & Ferreira A.J.P. (Eds), *Patologia Aviária*. Manole, Barueri, 2009.
- Tully J.G. & Razin S. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma: molecular characterization*. Academic Press, San Diego, CA, *Avian Diseases*, 22:707-716, 1995.
- Yoder Jr. H.W. Mycoplasmosis, p.169-198. In: Calneck B.W., Burnes H.J., Beard C.W. & Yoder Jr. H.W. (Eds), *Diseases of Poultry*. 9th ed. Iowa State University, Ames, 1991.