



## DETECÇÃO DE *Mycoplasma synoviae* NO OVIDUTO DE GALINHAS INOCULADAS COM CEPAS VACINAL E PADRÃO

Rita de Cássia Figueira Silva<sup>1</sup>, Virginia Léo de Almeida Pereira<sup>2</sup>, Lídia Maria Marques dos Santos<sup>1</sup>, Mariza Dinah Manes Brandão<sup>1</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>

1. Pós-Graduando (a) em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (rcassiasilva@gmail.com)
2. Professor (a) Doutor (a) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense Rua Vital Brazil, 64 Niterói, RJ – Brasil

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

### RESUMO

Na indústria avícola, o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *M. synoviae* (MS) são importantes patógenos para as criações de galinhas, responsáveis por grandes perdas econômicas. Em poedeiras comerciais, a infecção por MS pode causar doença respiratória, imunodepressão temporária e queda na produção de ovos e na eclodibilidade. Estudos recentes têm associado a infecção por MS à queda na produção de ovos, aumento na mortalidade e produção de ovos com anormalidades no ápice da casca. O objetivo deste estudo foi detectar MS por PCR no oviduto (magno e istmo) de galinhas inoculadas com cepas vacinal e padrão deste microrganismo. Cento e cinquenta aves, com oito semanas de idade, foram divididas aleatoriamente, em três grupos de 50 aves: aves inoculadas com cepa vacinal MS-H; aves inoculadas com cepa padrão MS WVU 1853 e aves não inoculadas (controle). Na 23<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semana de idade (SI) foram feitas necropsias para a coleta de fragmentos de traqueia, sacos aéreos, magno e istmo. O MS foi detectado pela PCR até a 29<sup>a</sup> SI, nas amostras de traqueia coletadas das aves inoculadas com as cepas MS vacinal e padrão. Entre as amostras de sacos aéreos, apenas as das aves inoculadas com a cepa padrão na 23<sup>a</sup> SI foram positivas para o MS. As amostras de magno e istmo das aves inoculadas com as cepas MS vacinal e padrão se mostraram positivas para esse agente apenas na 23<sup>a</sup> SI, as demais foram negativas. A detecção de MS nos tecidos do sistema reprodutivo das aves explica a transmissão vertical deste agente, mesmo na ausência de lesões macroscópicas, evidenciando a importância de monitoramento para MS em aves de reprodução e em poedeiras comerciais, garantindo a qualidade do ovo produzido.

**PALAVRAS-CHAVE:** micoplasmose, PCR, poedeiras, sistema reprodutivo.

## DETECTION OF *Mycoplasma synoviae* IN OVIDUCT OF HENS INOCULATED WITH VACCINE AND STANDARD STRAINS

### ABSTRACT

In the poultry industry, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) are important pathogens for the hens flocks, as they are responsible for high economic losses. In commercial layers, MS infection can cause respiratory disease, temporary immunodepression, drop in egg production and hatchability. Recent studies have associated MS infection to drop in egg production, increased mortality and eggs production with eggshell apex abnormalities. The objective of this study was to detect MS by PCR in the oviduct (magnum e isthmus) of birds inoculated with vaccine and standard MS strains. A total of 150 birds with eight weeks of age were randomly split into three groups of 50 each: inoculated with vaccine MS-H strain; inoculated with standard MS WVU 1853 strain and uninoculated (control). On the 23<sup>rd</sup>, 26<sup>th</sup>, 29<sup>th</sup>, and 32<sup>nd</sup> week of age (WA), necropsies were done for collection of fragments from trachea, air sacs, magnum and isthmus. MS was detected by PCR until 29<sup>th</sup> WA in tracheal samples collected from birds inoculated with vaccine and standard MS strains. Among the air sac samples, only those birds inoculated with standard MS strain at the 23<sup>rd</sup> WA were positive. Samples from magnum and isthmus of birds inoculated with vaccine and standard MS strains were positive for this agent only at the 23<sup>rd</sup> WA, being negative at all other sampling dates. MS detection in tissues of the reproductive tract of birds explains the vertical transmission of this agent, even in absence of macroscopic lesions, evidencing the importance of MS monitoring in poultry breeding and commercial layers, ensuring the quality of the egg produced.

**KEYWORDS:** mycoplasmosis, PCR, layers, reproductive tract

### INTRODUÇÃO

Na indústria avícola, o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *M. synoviae* (MS) são importantes patógenos para as criações de galinhas e responsáveis por grandes perdas econômicas. Nas aves, bactérias do gênero *Mycoplasma* têm predileção pelas membranas mucosas e serosas, onde podem causar problemas respiratórios, articulares e urogenitais (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). O MG é o agente etiológico da Doença Respiratória Crônica (DRC) e aerossaculite em galinhas e o MS está associado ao quadro de aerossaculite e sinovite (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). Segundo STIPKOVITS & KEMPF (1996) a infecção por MS em galinhas pode determinar um envolvimento articular (sinovite / artrite) ou uma infecção assintomática ou doença respiratória principalmente aerossaculite.

Nas criações de poedeiras comerciais, a infecção por MS pode causar o aparecimento de doença respiratória, imunodepressão temporária e queda na produção de ovos e na eclodibilidade, com altas taxas de mortalidade embrionária e refugos (STIPKOVITS & KEMPF, 1996); além do alto custo com medicamentos e programas de controle (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). Mais recentemente, estudo epidemiológico de DUFOR-GESBERT et al., (2006) em poedeiras comerciais mostrou que a infecção por MS é muito frequente em criações com idades múltiplas e pode causar queda na produção de ovos e aumento na mortalidade. Outros estudos relacionaram a infecção por MS à produção de ovos com anormalidades no ápice da casca, conhecida como EAA (Eggshell Apex Abnormalities), cuja etiologia foi associada a cepa do MS com tropismo para as células epiteliais do sistema reprodutivo (FEBERWEE et al., 2008; 2009).

A disseminação da infecção por MS pode ocorrer de forma horizontal, pelo contato direto com as secreções respiratórias de aves infectadas, ou verticalmente pelo oviduto (via ovo) (CERDÁ, 2009). Segundo STIPKOVITS & KEMPF (1996) a maior taxa de contaminação dos ovos ocorre entre as quatro ou seis primeiras semanas após a infecção. O ovo é infectado a partir de lesões dos sacos aéreos abdominais, ao ser liberado pelos ovários, contaminando na sequência o oviduto e os ovos produzidos a seguir (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009).

Nos plantéis avícolas nacionais e mundiais não se conhece a real prevalência e efeitos econômicos da infecção por MS. No Brasil, a investigação epidemiológica feita por BUIM et al., (2009) em estabelecimentos avícolas nos estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco revelou o aumento da incidência de MS e a redução de MG.

As cepas de MS podem ser diferenciadas quanto à patogenicidade, virulência, genética e tropismo, porém essas diferenças não podem ser detectadas nos exames sorológicos, é preciso realizar outros exames laboratoriais como o isolamento, os ensaios experimentais e as técnicas biomoleculares (STIPKOVITS & KEMPF, 1996). Na atualidade, a PCR é uma técnica útil e em expansão na micoplasmologia, porque utiliza “primers” genéricos e específicos para algumas espécies de micoplasmas (TIMNETSKY, 2009). No caso dos micoplasmas aviários, a PCR tem sido aplicada ao diagnóstico do MG, MS, *M.meleagridis* e *M.iowae*, devido a rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica (METTIFOGO & BUIM, 2009). A sensibilidade da PCR em relação ao isolamento do MS e MG foi comprovada por YILMAZ et al., (2011).

O objetivo deste estudo foi detectar MS por PCR no oviduto (magno e istmo) de galinhas inoculadas com cepas vacinal e padrão deste microrganismo.

## METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos do Instituto Biológico com o protocolo de execução aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense - UFF (projeto nº88/2011).

Foram utilizadas 150 galinhas da linhagem Hy-Line W-36, com idade inicial de oito semanas, distribuídas em três grupos de 50 aves, constituindo de três blocos ao acaso com três tratamentos, sendo 10 repetições/tratamento e cinco aves/repetição. Os tratamentos consistiram em três protocolos: T1, com aves inoculadas com cepa MS-H vacinal (Merial®); T2, com aves inoculadas com cepa MS padrão e T3, com aves controle, não inoculadas. A cepa vacinal foi adquirida no comércio e a padrão foi cedida pelo Núcleo de Diagnóstico da Micoplasmose da UFF - NUDMIC/UFF. As aves foram alojadas em 30 gaiolas de arame galvanizado, com a densidade de cinco aves por gaiola, equipadas com comedouro tipo cocho e bebedouros tipo “nipple”, instaladas em galpões telados lateralmente e cobertos por telhas de barro. A ração e a água foram fornecidas à vontade durante todo o período experimental. A ração fornecida foi formulada de acordo com as exigências nutricionais da linhagem em cada fase de criação.

Durante o experimento as aves foram debicadas aos sete dias de idade, com repasse na 11ª semana e vacinadas contra as doenças de Marek, Gumboro e Newcastle, Boubá Aviária, Bronquite Infeciosa, Metapneumovirose, Coriza Infeciosa, Laringotraqueíte Infeciosa e Síndrome da Queda de Postura.

Para verificar a presença de anticorpos contra MS e MG, antes da infecção experimental, todas as aves foram sangradas e os soros, inativados a 56°C/30 minutos, foram testados pela soroaglutinação rápida (SAR). Na 9ª semana de idade

(SI) as aves do T1 foram inoculadas com uma gota ocular (0,03mL) da cepa vacinal MS-H ( $\geq 10$  CCU/0,03mL). As aves do T2 foram inoculadas na 12<sup>a</sup> SI ( $< 10$  CCU/0,03mL) e na 18<sup>a</sup> SI ( $3 \times 10^2$  CCU/0,03mL) com a cepa padrão MS-WVU 1853 - ATCC 25204. Neste tratamento foram feitas duas inoculações, porque o título da cepa padrão estava abaixo do título da cepa vacinal.

Na 23<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 29<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> SI foram retiradas, aleatoriamente, três aves de cada tratamento para necropsia, na qual foi feita uma avaliação macroscópica do trato respiratório e dos tecidos do sistema reprodutivo das aves. Em seguida, foram coletados fragmentos de traqueia, sacos aéreos, magno e istmo em meio de Frey modificado e feitos "pools" constituídos de três fragmentos de cada tecido e macerados por tratamento. Cada amostra foi submetida à PCR com "primers" específicos para MS (LAUERMAN, 1993): MS-f (5'GAGAAGCAAATAGTGATATCA3') e MS-r (5'CAGTCGTCTCCGAAGTTA ACAAA 3') que amplificam 207 pb.

A extração de DNA foi realizada pelo método Fenol/clorofórmio adaptado de SAMBROOK et al. 1989. Cada tubo Eppendorf para a reação continha: 56  $\mu$ L de Milli-Q água, 10  $\mu$ L de tampão PCR 10X, 5  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 5  $\mu$ L do DNTPmix (0,25 mM de cada DNTP), 2  $\mu$ L (100 pmol) de cada "primer", 20  $\mu$ L de amostra de DNA e 2 U de Taq Polimerase, totalizando 100  $\mu$ L. O controle positivo foi feito com a amostra padrão MS WVU 1853, enquanto que o negativo com uma cepa de MG (ATCC 19610). A PCR foi realizada a 94°C/3 minutos, seguidos por 39 ciclos de 94°C/1 minuto; 52°C/1 minuto e 72°C/2 minutos, finalizando com 72°C/5 minutos e refrigeração a 4°C/10 minutos. Os amplicons obtidos foram visualizados sob transiluminador com luz ultravioleta, após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os soros coletados no início do experimento e testados pela SAR foram negativos para MS e MG e nenhuma das aves inoculadas com as cepas de MS apresentou sinais clínicos respiratórios ou lesões macroscópicas nos sacos aéreos e na traqueia compatíveis com micoplasmose, bem como nos tecidos do sistema reprodutivo. LOCKABY et al., (1998) observaram em aves submetidas à inoculação com MS, via coxim plantar ou intravenosa, maior frequência de um quadro de sinovite, do que um quadro respiratório e quando as aves foram inoculadas pela via respiratória (intrasinus ou intranasal), a infecção foi inaparente ou com quadro de aerossaculite.

À PCR, foi detectado MS até a 29<sup>a</sup> SI, nas amostras de traqueia coletadas das aves inoculadas com as cepas MS vacinal (T1) e padrão (T2) conforme Tabela 1. Estes resultados concordam com os de LAUERMAN et al., (1993) que também utilizaram a mesma técnica para a detecção do MS em fragmentos de traqueia. Entre as amostras de sacos aéreos, apenas as das aves inoculadas com a cepa padrão (T2) na 23<sup>a</sup> SI foram positivas para o MS, as demais foram negativas (Tabela 1). Em um estudo à campo, empregando a técnica de PCR, em "pools" de sacos aéreos lesados, MINHARRO et al., (2001) detectaram MS e MG.

As amostras de magno e istmo das aves inoculadas com as cepas MS vacinal e padrão se mostraram positivas para esse agente na 23<sup>a</sup> SI, as demais amostras processadas foram negativas (Tabela 1). No estudo experimental de FEBERWEE et al., (2008) o MS foi isolado no oviduto de aves que produziram ovos com EEA. Estes resultados confirmam a transmissão vertical (via ovo), do MS como importante fator na disseminação desse patógeno em plantéis avícolas. Todas as amostras

coletadas das aves não inoculadas (T3) foram negativas.

**TABELA 1.** Detecção de *Mycoplasma synoviae* por PCR na traqueia, nos sacos aéreos, no magno e no istmo de galinhas inoculadas com cepas MS vacinal (T1) e padrão (T2).

| AMOSTRAS<br>PROCESSADAS | RESULTADOS DA PCR |                 |                 |                 |
|-------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                         | IDADE (semanas)   |                 |                 |                 |
|                         | 23 <sup>a</sup>   | 26 <sup>a</sup> | 29 <sup>a</sup> | 32 <sup>a</sup> |
|                         | T1/T2             | T1/T2           | T1/T2           | T1/T2           |
| Traqueia                | +/+               | +/+             | +/+             | -/-             |
| Sacos Aéreos            | -/+               | -/-             | -/-             | -/-             |
| Magno                   | +/+               | -/-             | -/-             | -/-             |
| Istmo                   | +/+               | -/-             | -/-             | -/-             |

### CONCLUSÃO

A detecção de MS pela PCR nos tecidos do sistema reprodutivo das aves pode explicar a transmissão vertical deste agente, mesmo sem provocar alterações macroscópicas, evidenciando a importância de monitoramento para esse agente infeccioso, principalmente em aves de reprodução e em poedeiras comerciais, pela possibilidade de contaminação e comprometimento da casca do ovo, com prejuízos para a qualidade desse produto.

### AGRADECIMENTOS

À FAPERJ, CNPq e EMBRAPA pelo apoio financeiro e à equipe da Dr<sup>a</sup> Nilce Maria Soares e do Dr. Marcos Roberto Buim da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos - Instituto Biológico/SAA-SP pelo apoio nas atividades á campo e laboratoriais.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUIM, M. R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A. J. P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.27, n.7, p. 552-556, 2009.

CERDÁ, R. O. *Mycoplasma synoviae*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, p. 101-107, 2009.

DUFOUR-GESBERT, F; DHEILLY, A.; MAROIS, C.; KEMPF, I. Epidemiological **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 620 2012

study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.114, p. 148-154, 2006.

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

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

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

LOCKABY, S. B.; HOERR, F. J.; LAUERMAN, L. H.; KLEVEN, S, H, Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. **Veterinary Pathology**, Ithaca, v.35, n.3, p. 178-190, 1998.

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 86-100.

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**, Goiânia, v.2, n.2, p. 111-117, 2001.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 485-502.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2ª. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.2, p.3-15, 1989.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Micoplasmoses in poultry. **Review Science Technology of OIE**, n.15, p.1495-1525, 1996.

TIMNETSKY, J. Micoplasmoses – conceitos gerais. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. p. 82-85.

YILMAZ, F.; TIMURKAAN, N.; KILIÇ, A.; KALENDER, H.; KILINÇ, Ü. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v.162, n.2, p.79-86, 2011.