CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MYCOPLASMA DA AVICULTURA INDUSTRIAL DOS ESTADOS DE MINAS GERAIS E ESPÍRITO SANTO

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
UFMG Escola de Veterinária
2013

Gomes, Alexis de Matos, 1974
G633c Caracterização molecular de isolados de micoplasmas da avicultura industrial de Minas Gerais e Espírito Santo / Alexis de Matos Gomes. – 2013.

59 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Ave poedeira – Doenças – Teses. 2. Frango de corte – Doenças – Teses.
2. Micoplasma - Teses. 4. Vacinas – Teses. 1. Martins, Nelson Rodrigo da Silva.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 636.508 9

SUMÁRIO

	RESUMO	01
	ABSTRACT	01
1.	**INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA**	03
2.	**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**	05
1.	Micoplasmas aviários	05
1.1.	Características gerais	05
1.2.	Genoma	06
1.3.	Atividade metabólica	06
2.	Micoplamoses nas aves	07
2.1.	Etiologia e importância na indústria avícola	07
2.2	Epidemiologia e ocorrência de doença respiratória associada à micoplasmas na avicultura do Brasil	08
2.3.	Transmissão	09
2.4.	Diagnóstico sorológico e cultivo	09
2.5.	Detecção de micoplasmas e PCR	09
2.6.	Diferenciação das estirpes de micoplasmas: caracterização filogenética e genotipagem	10
2.7.	Controle dos estabelecimentos avícolas ou núcleos controlados	11
2.8.	Aspectos clínicos e patogênese	12
3.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	13
4.	**OBJETIVOS**	18
4.1	Geral	18
4.2	Específicos	18
5.	**MATERIAL E MÉTODOS**	18
5.1	Local da realização do experimento	18
5.2	Amostragem	18
5.3	Pré-enriquecimento dos suabes de traqueia em caldo	18
5.4	Extração do DNA das amostras de suabes de traqueia, vacinas e antígenos coloridos para SAR	18
5.5	Extração do DNA das amostras pré-enriquecidas	20
5.6	Determinação espectofotométrica da concentração de DNA total das amostras	20
5.7	Padronização da PCR	20
5.7.1	Iniciadores	20
5.7.2	Concentração de reagentes	20
5.7.3	Curva de calibração da temperatura ótima de anelamento	21
5.7.4	Reprodutibilidade	21
5.7.5	Sensibilidade e especificidade	21
5.8	Análise dos produtos amplificados	21
5.9	Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	21
5.10	Sequenciamento genético	21
5.11	Reação de sequenciamento	21
5.12	Análise das sequências	22
5.14	Comparação das sequências	22
5.13	Alinhamento das sequências	22
5.14	Estudo filogenético	22
5.16	Cálculo das distâncias filogenéticas	22
5.17	Criopreservação das estirpes de micoplasma	22
6.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	23
CAPÍTULO I	**TIPAGEM GENOTÍPICA E DINÂMICA DO CULTIVO DE MYCOPLASMAS ORI UNDOS DE AVES INDUSTRIAIS**	25
	RESUMO	25
	ABSTRACT	25
1.	**INTRODUÇÃO**	26
2.	**MATERIAL E MÉTODOS**	26
3.	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	27
4.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	35
CAPÍTULO II	**ESTUDO FILOGENÉTICO E DE LETALIDADE EMBRIONÁRIA DE *MYCOPLASMA GALLINARUM* ISOLADOS DA AVICULTURA INDUSTRIAL DE POSTURA**	38
	RESUMO	38
	ABSTRACT	38
1.	**INTRODUÇÃO**	40
2.	**MATERIAL E MÉTODOS**	41
3.	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	42

4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO III	ESTUDO FILOGENÉTICO DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* EM GALINHAS DA AVICULTURA INDUSTRIALDE MINAS GERAIS	50
	RESUMO	50
	ABSTRACT	50
1.	INTRODUÇÃO	51
2.	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5.	CONSIDERAÇOES FINAIS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividade metabólica *in vitro* de micoplasmas em aves	07
Tabela 2	Características das amostras provenientes de segmentos da atividade avícola dos dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, no período de maio/2011 a outubro/2012	19
Tabela 3	Identificação das vacinas e antígenos coloridos para SAR utilizados como controles positivos	20
Tabela 4	Espécies de micoplasmas aviários e o tamanho molecular da região IGRS	23
Tabela 5	Sequências de nucleotídeos de *Mycoplasma gallisepticum* e estirpes de referência usadas na geração da árvore (grupo filogenético Pneumoniae)	32
Tabela 6	Sequências de nucleotídeos de MGN, MIN, MGC, MP, MGL e estirpes de referência usadas na geração da árvore (grupo filogenético Hominis)	33
Tabela 7	Atividade metabólica da glicose para as estirpes de micoplasmas pré-enriquecidos em caldo de Frey a 37ºC durante 144 horas	35
Tabela 8	Iniciadores específicos para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* utilizados na PCR	40
Tabela 9	Frequência média das alterações inflamatórias observadas em cada embrião de galinha incubado/não inoculado, inoculado com meio de Frey e inoculados com MGN mortos ou eutanasiados aos 19 dias de incubação	42
Tabela 10	Iniciadores universal e específico utilizados nas PCRs IGRS de sequenciamento e MG de detecção	53
Tabela 11	Percentual de similaridade (%) entre as sequências de nucleotídeos da região IGRS das estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* deste estudo comparativo com as disponibilizadas no Gen Bank	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese dos produtos da PCR IGRS para diferenciação de bactérias do gênero *Mycoplasma*	28
Figura 2	Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas e evolutivas baseadas nas sequências de nucleotídeos da região IGRS entre as 54 estirpes do gênero *Mycoplasma* obtidas no estudo. replicações	29
Figura 3	Distribuição das espécies encontradas de micoplasmas genotipados da avicultura industrial no período maio/2011 a outubro/2012	30
Figura 4	Efeito de nanismo e "encurvamento" embrionário em ovo SPF	43
Figura 5	Histopatologia (HE) de Pulmão (100x)	43
Figura 6	Histopatologia (HE) de Pulmão (400x)	44
Figura 7	Histopatologia (HE) de Fígado (100x)	44
Figura 8	Relação filogenética entre estirpes de *Mycoplasma gallinarum* (MGN) de poedeiras (P) e de um reprodutor (R) de 1000-bootstrap	45
Figura 9	Curva de letalidade das estirpes de *Mycoplasma gallinarum* do estado do Espírito Santo oriundas de poedeiras	47
Figura 10	Relação filogenética entre estirpes de *Mycoplasma gallisseptium* (MG) de poedeiras (P), frangos de corte (FC) e reprodutores (R)	55

RESUMO

Realizou-se a genotipagem de 54 estirpes de *Mycoplasma* sp obtidas de três lotes de poedeiras do estado de Minas Gerais (n=71), um lote de poedeiras do estado do Espírito Santo (n=12), dois lotes de frango de corte (n=21) e um lote de reprodutores (n=18) do estado de Minas Gerais, com o objetivo de se levantar a frequência relativa e a relação filogenética de micoplasmas das estirpes encontradas na avicultura industrial de dois estados do Brasil. As sequências de nucleotídeos obtidas por PCR universal para a amplificação da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (IGRS) foram alinhadas e as variações de nucleotídeos utilizadas na caracterização genética. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências de estirpes depositadas no GenBank: PG31, *Mycoplasma gallisepticum* (MG); WVU 1853, *M. synoviae (*MS); 17529, *M. meleagridis* (MM); 695, M. *iowae* (MI); PG16, *M. gallinarum* (MGN); PG30, *M. iners* (MIN); DD, *M. gallinaceum* (MGC); CKK, *M. pullorum* (MP) e 486, *M. glycophilum* (MGL). Os resultados obtidos do produto do sequenciamento genético do gênero *Mycoplasma* identificaram 27,8% das estirpes com MGN; 20,4% com o MIN; 18,5% com o MP; 18,5% com o MG; 11,1% com o MGC; 3,7% com o MGL; 0% com o MM e 0% com o MI. Quatorze estirpes de MG foram sequenciadas, incluindo três vacinas comerciais, dois antígenos coloridos e nove estirpes obtidas da avicultura industrial. As sequências de nucleotídeos obtidas de MG foram também alinhadas às sequências de estirpes de MG selvagens e vacinais de diferentes partes do mundo. As sequências de nucleotídeos obtidas do estudo foram alinhadas às sequências de duas estirpes de vacinas vivas (VAC1 e VAC3) e uma vacina inativada (VAC2), utilizadas na produção de vacinas comerciais, para avaliação da circulação destas estirpes vacinais na produção avícola. Foi também avaliada a ocorrência de MG em reprodutores da avicultura industrial. Em 16,66% (3/18) das aves testadas foi detectado o genoma do MG. A detecção de estirpe vacinal de MG em reprodutores alerta para o risco de escape de vacina viva, potencialmente originária de poedeiras, para reprodutores, com eventuais prejuízos ao programa institucional de controle e erradicação de MG. Outro ponto importante foi a comparação entre as relações filogenéticas das sequências de estirpes de MGN do estado do Espírito Santo de poedeiras com sintomas clínicos de doença respiratória com as sequências das estirpes de MGN comensais de poedeiras hígidas do estado de Minas Gerais. Os resultados apontaram uma discreta distância filogenética entre as estirpes de MGN do estado de Minas Gerais. Apesar deste grupo filogenético apresentar relação geográfica com as estirpes de MGN do estado do Espírito Santo, este último grupo não apresentou distância filogenética entre si.

ABSTRACT

Fifty-four genotypic strains of *Mycoplasma* sp were obtained from three flocks of hens of Minas Gerais, one flock of hens of Espírito Santo, two flocks of broiler chickens of Espírito Santo and one flock of breeder of Minas Gerais (n=122). In order to determine the occurrence of mycoplasmas and the phylogenetic realtion of strains found in the poultry industry in the two states of Brazil, the nucleotide sequences were aligned and the variations of the transcribed region of the 16S and 23S intergenic ribosomal RNA space (IGRS) were used in the genetic characterization of strains. The nucleotide sequences were compared with sequences of strains accessible in GenBank: PG31, *Mycoplasma gallisepticum* (MG); WVU 1853, *M. synoviae* (MS); 17529, *M. meleagridis* (MM); 695, M. *iowae* (MI); PG16, *M. gallinarum* (MGN); PG30, *M. iners* (MIN); DD, *M. gallinaceum* (MGC); CKK, *M. pullorum* (MP) e 486, *M. glycophilum* (MGL). The results obtained for the *Mycoplasma* IGRS genetic sequencing clustered isolates were: 28.3% similar to MGN, 20.8% to MIN, 18.9% to MP, 17.0% to MG, 11.3% to MGC; 3 8% to MGL, 0% to MM and 0% to MI. Fourteen strains of MG were sequenced, including three commercial vaccines, two gglutination plate antigens and nine strains from ther poultry industry. The nucleotide sequences obtained were compared with sequences of field and vaccine strains of different parts of the world. The nucleotide sequences were aligned with the sequences of live vaccine strains used in the production of commercial vaccines (VAC1 and VAC3) and one inactivated vaccine (VAC2). The occurrence of MG vaccine strain in 3/18 (16.66%) of breeders tested indicated vaccine strain transfer,

possibly from vaccinated layers, and recommends for strickt biosecurity. The live MG vaccine strains may represent an important risk for the official poultry health program. The phylogenetic relationship of the sequences of strains of MGN of Espírito Santo isolated from laying hens with respiratory signs with the sequences of non-pathogenic MGN strains isolated from healthy hens of the State of Minas Gerais was determined. MGN strains of Minas Gerais showed a discrete phylogenetic distance, while Espírito Santo MGN strains were highly related.

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

Apesar do impacto da crise econômica de 2008, o setor avícola permanece em franca expansão por todo o mundo. Segundo o boletim divulgado pelo United States Departament of Agriculture (USDA), para o referido ano, a produção mundial de carne de frango foi de aproximadamente 70 milhões de toneladas, o que representou a expansão de 4,4% em relação à pauta de exportação deste produtos cárneos em 2007.

Em 2011, a produção de carne de frango do Brasil chegou a aproximadamente 13,1 milhões de toneladas, e manteve um crescimento de 6,8% em relação a 2010. A produção chinesa foi de 13,2 milhões de toneladas, estando abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,8 milhões de toneladas. Com este desempenho, o Brasil se aproximou da China, que é hoje o segundo maior produtor mundial de carne de frango.

Neste contexto, a realidade brasileira não difere do cenário mundial. O país mantém a carne de frango em posição de destaque, não somente por ser fonte de proteína animal acessível às camadas socioeconômicas de baixa renda, mas também por constituir um dos principais produtos de venda para o mercado externo. O agronegócio avícola brasileiro movimenta em torno de 18,2 bilhões de reais ao ano e representa 2% do produto interno bruto (PIB) para a balança comercial do Brasil.

Devido à importância social e econômica da produção avícola, o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) estabeleceu normas e diretrizes para o controle da sanidade avícola com vistas na melhora da produção e qualidade dos produtos avícolas para o mercado interno e no atendimento das exigências do comércio de exportação.

Segundo especialistas em sanidade avícola e produtores, as doenças respiratórias representam grandes perdas econômicas na indústria. Em 1994, dados do Serviço de Inspeção Federal (SIF) apontaram a perda de 34 mil toneladas de carne de frango na fase final de produção devido às doenças respiratórias e prejuízo de 54,6 milhões de reais.

Fatores que predispõem às doenças respiratórias nas aves, como prática de manejo estressante, falta de estratégia de biosseguridade, intensificação das regiões produtoras e condições ambientais que não permitem o controle de agentes patogênicos, acabam por contribuir para o aumento dos desafios sanitários.

Nos mais diversos contextos do sistema de produção avícola mundial, 25 espécies de micoplasmas aviários, tanto comensais como patogênicos, foram descritas em aves domésticas, da fauna silvestre e exótica.

Os micoplasmas são bactérias da classe *Mollicutes*, família *Mycoplasmatacea*, gênero *Mycoplasma*, que não possuem parede celular e representam o menor micro-organismo auto replicante conhecido, com genoma de aproximadamente 5 Mb. Nas aves, apresenta predileção em colonizar a mucosa do trato respiratório, urogenital e membrana articular.

Como espécies patogênicas e de importância para indústria avícola são descritos quatro micoplasmas, em criações comerciais em todo o mundo: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MN) e *Mycoplasma iowae* (MI). Apesar da importância econômica ainda desconhecida, na década de 90, outras espécies de micoplasmas potencialmente patogênicos também foram relatadas em cortes histológicos de figado e ovidutos de galinhas naturalmente infectadas, como *Mycoplasma gallinarum* e *Mycoplasma gallinaceum*.

Mycoplasma meleagridis é espécie-específico de perus, provocando redução na eclodibilidade dos ovos, diminuindo a viabilidade de aves jovens e afetando os sacos aéreos. *Mycoplasma iowae* é considerado emergente na produção avícola e tem maiores perdas econômicas relacionadas à letalidade embrionária em criatórios de perus.

Mycoplasma gallisepticum e *Mycoplasma synoviae* são micoplasmas de notável relevância econômica na indústria avícola e podem causar a forma clássica de infecção caracterizada pela doença respiratória crônica (DRC) das galinhas e sinusite dos perus. Na micoplasmose por MG

e MS, os sacos aéreos e ovidutos das aves estão comumente afetados.

A infecção por MG pode ser especialmente importante em frangos de corte, devido ao fato do seu frequente sinergismo com outros agentes, como vírus respiratórios ou estirpes de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC). Em poedeiras comerciais, o MG causa queda na produção de ovos principalmente por infecção descendente a partir dos sacos aéreos, que contaminam os óvulos, infundíbulo e, possivelmente, as regiões mais baixas dos ovidutos das aves.

De uma maneira geral, a infecção por MS aparece na forma subclínica, com baixo impacto nos índices produtivos para aves adultas, embora contribua na etiologia da sinovite e artrite em matrizes pesadas. A progênie do lote afetado por MS aparece constantemente afetada, com elevado índice de descarte em função de lesão de sacos aéreos, índice de conversão alimentar negativo e redução no ganho de peso.

Lotes desuniformes, retardo no crescimento, perdas na produção de ovos, custos com medicação, condenação no processamento da carcaça dos frangos e mortalidade são impactos econômicos importantes de MG e MS na produção avícola.

A transmissão de MG e MS ocorre horizontalmente, via contato direto ou indireto, pela secreção respiratória, ou verticalmente no ovário e oviduto. A disseminação horizontal é muito rápida entre aves de um mesmo galpão, em torno de 100% das aves em poucas semanas. Em reprodutoras comerciais, a transmissão vertical mostra ser a maior barreira na erradicação da enfermidade pela alta taxa de transmissão de micoplasmas à progênie na fase aguda da doença, que pode apresentar variação de 10 a 40% dos ovos incubáveis.

O tratamento atua apenas na redução da população de MG e MS do trato respiratório, portanto, no controle dos sinais clinicos, diminuição das perdas econômicas da produção avícola e diretamente como barreira à transmissão da doença. Várias bases farmacológicas são utilizadas na avicultura brasileira, como tilosina, enrofloxacina, quinolonas e macrolídeos.

O controle do MG e MS nas grandes populações de aves situadas em pequenas regiões geográficas através da adoção das práticas de biosseguridade e vigilância sorológica, muitas vezes, é medida de difícil acesso devido à grande densidade de estabelecimentos nestas regiões de produção avícola e seu elevado custo.

A vacinação contra MG provenientes de vacinas com estirpes virais e inativadas oleosas é usada em regiões de produção intensificada, onde há risco de infecção e a erradicação ainda não é praticada. A vacina atua na prevenção das perdas da produção de ovos, condenação dos frangos pela aerossaculite e transmissão de MG ave-ave. A vacinação é realizada com o objetivo de reduzir os altos custos dos tratamentos com antibióticos e, tardiamente, minimiza o aparecimento dos sinais clínicos da DRC nas aves.

Algumas técnicas recomendadas pelo PNSA são utilizadas para a pesquisa de anticorpos para MG e MS no soro, como soroaglutinação rápida em placa (SAR), inibição da hemaglutinação (IH) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Infecções por MG e MS são confirmadas pelo isolamento, pela identificação bioquímica e detecção do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em espécimes clínicos.

Os micoplasmas carecem de muitas das vias de biossíntese e, por conseguinte, o seu crescimento e sobrevivência dependem de suprimento externo de uma ampla variedade de nutrientes. Estirpes de micoplasmas fastidiosos, como algumas estirpes de MG, são extremamente exigentes em suas necessidades nutricionais e requerem meio de crescimento complexo para seu cultivo.

Outro fator que contribui para a dificuldade com o cultivo e a PCR está relacionado à sensibilidade dos micoplasmas em relação aos tratamentos com antimicrobianos específicos, e também aos seus mecanismos de escape do sistema imunológico e tecidos do hospedeiro.

O isolamento de estirpe de MG de difícil crescimento é facilitado pelo bioensaio *in vivo*. Ovos SPF (*specific pathogen free* - livre de patógenos específicos) são inoculados com

material infeccioso de aves suspeitas. Os micoplasmas podem oportunamente se multiplicar em sistemas biológicos e melhorar a possibilidade de isolamento das amostras.

Os micoplasmas isolados são comumente identificados pelas técnicas de tipagem fenotípica pela identificação da presença de antígenos capsulares. Técnicas de tipagem fenotípica utilizadas na identificação de micoplasma são a imunofluorescência (IF) direta e indireta. A produção de soro hiperimune espécie-específico é insumo essencial para IF, tornando a técnica limitada a poucos laboratórios de pesquisa que dispõem dos reagentes.

Estirpes de micoplasmas não cultiváveis ou fastidiosos podem dificultar a tipagem fenotípica das colônias pela não expressão ou expressão tardia do gene codificador, respectivamente. Isso acarreta uma baixa qualidade e pouca repetibilidade da técnica de IF.

É desejável que um método de tipificação de estirpes forneça elevado índice discriminatório, de modo a agruparem-se estirpes semelhantes de regiões geográficas distintas, ou então demonstrarmos distância filogenética entre as estirpes distintas. A técnica também deve apresentar boa reprodutibilidade, caracterizada pela capacidade de uma técnica de reproduzir o mesmo resultado, quando uma estirpe em particular é repetidamente testada. Isto é especialmente importante para a construção de base de dados moleculares ou bioquímicos dos micoplasmas conhecidos dentro dos sistemas de criação de poedeiras, reprodutores e frangos de corte, nos quais as estirpes de micoplasmas possam ser comparadas.

É indiscutível que a tipagem genotípica apresenta maior reprodutibilidade, sensibilidade e menor variabilidade que a técnica de tipagem fenotípica tradicional. Por várias décadas, a caracterização molecular das estirpes de MG e rastreamento das infecções por estirpes selvagens de campo ou vacinais pelo uso de técnicas moleculares como a análise de polimorfismo do DNA após amplificação aleatória (RAPD) e a técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) foram de ampla utilização em estirpes de MG de galinhas da indústria avícola brasileira. Porém, as técnicas de RAPD e PFGE, comparadas à análise das sequências de nucleotídeos de uma porção menor do genoma, demonstraram baixa reprodutibilidade, além de haver dificuldades na padronização e comparação deficiente de resultados entre laboratórios.

Este trabalho teve como objetivo geral pesquisar a presença de micoplasmas em amostras de galinhas oriundas da indústria avícola, pela detecção e sequenciamento genômico, tendo suas relações moleculares evolutivas e filogenéticas avaliadas. Por outro viés mais específico, foi proposta a identificação de espécies e subtipos clonais, caracterização e comparação genotípica das estirpes, determinado assim a ocorrência das estirpes de micoplasmas nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Micoplasmas aviários

1.1. Características gerais

As bactérias do gênero *Mycoplasma* pertencem à divisão *Tenericutis*, à classe *Mollicutes* (*molis* = macio / *cútis* = pele), da ordem *Mycoplasmatales* e da família *Mycoplasmatacea*. São os menores micro-organismos auto replicantes conhecidos, caracterizados pela ausência de parede celular e apresentam citoplasma somente envolvido por única membrana trilaminar, genoma de pequeno tamanho e pouco conteúdo G+C (SIRAND-PUGNET *et al*., 2007).

A ausência da parede celular confere aos micoplasmas elevado pleomorfismo, além de torná-los osmoticamente frágeis e naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam na síntese da parede celular, como as penicilinas (RAZIN *et al*., 1998).

Os micoplasmas são micro-organismos patogênicos ou comensais de ampla variedade de hospedeiros; incluindo dentre eles os animais, o homem, os insetos e as plantas. Segundo o *International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the*

Taxonomy of Mollicutes, os micoplasmas são considerados suficientemente distintos das bactérias providas de parede celular e foram separados na divisão *Tenericutis*, que compreende quatro ordens e oito gêneros (REVISED, 1995).

Apesar da ausência da parede celular, os micoplasmas podem sobreviver em superfícies secas por vários dias, desde que protegidos da luz solar. A membrana celular é rica em colesterol, que de maneira geral é suplementado ao meio de cultura pelo soro animal, o que possibilita estabilidade da fluidez da membrana e confere ao agente certa proteção às variações do meio ambiente (NASCIMENTO e PEREIRA, 2009).

1.2. Genoma

Segundo MANILOFF (1983), em relação à organização do genoma, os micoplasmas constituem um dos principais ramos evolutivos das bactérias gram-positivas. Durante o processo de evolução do domínio *Archaea*, os micoplasmas perderam porções consideráveis dos seus cromossomos e, portanto, vias de biossíntese importantes. Porém, neles mantiveram-se preservados os genes essenciais para a manutenção da vida

A análise filogenética da classe *Mollicutes* sugere que os micoplasmas se originaram a partir de bactérias do gênero *Clostridium*, pela evolução regressiva e redução do genoma, durante milhões de anos de adaptação aos seus hospedeiros naturais e ocupação de novos nichos ecológicos (WOESE *et al*., 1984; WEISBURG *et al*., 1989; RAZIN *et al*, 1998).

Ao contrário dos demais procariotas, todas as funções dos micoplasmas são expressas a partir de conjuntos de genes relativamente limitados. O número de genes no genoma de *Mycoplasma genitalium* é aproximadamente duas vezes o número mínimo de genes necessários para suportar a auto replicação de um micro-organismo (MUSHEGIAN e KOONIN, 1996; HUTCHISON *et al*., 1999).

Segundo RAZIN *et al*. (1998), o genoma dos micoplasmas compreende sistemas complexos para a regulação do gene, que resultam na variação da estrutura e expressão de produtos de genes específicos. Estes sistemas incluem um conjunto de genes capaz de reverter para fenótipos alternativos em mutações reversíveis. O resultado é o potencial de adaptação de fenótipos mutantes na microbiota da ave, o que corresponde à principal estratégia de sobrevivência dos micoplasmas.

O alto grau de variação fenotípica dos micoplasmas é um importante fator na patogenicidade das estirpes, que pode resultar na forma crônica de micoplasmose nas aves (YOGEV *et al*., 1991; ROSENGARTEN *et al*., 1994; ROSENGARTEN e YOGEV, 1996; RAZIN *et al*., 1998).

1.3. Atividade metabólica

Os micoplasmas apresentam restrita atividade metabólica e seu catabolismo primário está principalmente associado à geração primária de ATP, em detrimento à biossíntese de precursores secundários das vias do metabolismo anabólico aeróbio, comuns nas vias metabólicas das bactérias (MILES, 1992).

As principais vias bioquímicas de obtenção de energia observadas nos micoplasmas podem ser: fermentação de açúcares a lactato - pela via do piruvato ou a oxidação parcial de ácidos orgânicos - de lactato/piruvato a acetato e CO_2 ou metabolismo da arginina a ornitina, NH_3 e CO_2 - pela via da arginina-dihidrolase (POLLACK, 1992).

Os micoplasmas podem usar uma ou qualquer combinação destas vias bioquímicas para a obtenção de energia, permitindo a subdivisão do gênero em grupos fisiológicos distintos (MILES *et al*., 1994). Dentro destes grupos, os padrões e as taxas de utilização de determinados substratos são utilizados para distinguir t*axons* sub específicos, na identificação presuntiva e caracterização bioquímica (TAYLOR *et al*., 1996).

Além disso, o conhecimento dos substratos utilizados pelos micoplasmas e sua dinâmica de utilização, pode melhorar a compreensão sobre a patogenicidade das estirpes. Os dados da dinâmica de crescimento das estirpes de micoplasma são importantes para permitir a predição da significância do metabolismo de um

determinado substrato nas concentrações *in vitro*, em relação à disponibilidade nos tecidos do hospedeiro (MILES *et al*., 1991).

De maneira geral, a utilização de substratos de altos níveis de energia em taxas elevadas *in vitro*, a exemplo do metabolismo da glicose e arginina (Tab. 1), indica alta adaptação do micoplasma para esse substrato no tecido do hospedeiro. A redução da disponibilidade do substrato na célula hospedeira resulta na formação de produtos tóxicos, particularmente peróxido de hidrogênio, a partir do metabolismo de cada substrato utilizado (MILES *et al*., 1991; TAYLOR *et al*., 1996).

Tabela 1. Atividade metabólica *in vitro* de micoplasmas encontrados em aves

Espécie	Hospedeiro	Metabolismo da glicose/ arginina
M. anatis	pato	pos/neg
M. anseris	ganso	neg/pos
M. buteonis	urubu	pos/neg
M. cloacale	peru, ganso	neg/pos
M. columbinasale	pombo	neg/pos
M. columbinum	pombo	neg/pos
M. columborale	pombo	pos/neg
M. corogypsi	abutre	pos/neg
M. falconis	falcão	neg/pos
M. gallinaceum	galinha	pos/neg
M. gallinarum	galinha, peru	neg/pos
M. gallisepticum	galinha, peru, faisão, perdiz	pos/neg
M. gallopavonis	peru	pos/neg
M. glycophilum	galinha	pos/neg
M. gypis	abutre	neg/pos
M. iners	galinha, peru	neg/pos
M. iowae	galinha, peru	pos/pos
M. imitans	ganso, pato, perdiz	pos/neg
M. lipofaciens	galinha, peru	pos/pos
M. meleagridis	peru	neg/pos
M. pullorum	galinha	pos/neg
M. sturni	estorninho europeu	pos/neg
M. synoviae	galinha, peru	pos/neg

Fonte:Adapatado de BRADBURY (2010).

2. Micoplasmoses nas aves

2.1. Etiologia e importância na indústria avícola

Segundo KLEVEN (2003), 23 espécies de micoplasmas são descritas em aves, conforme apresentado na Tabela 1, entretanto, os de reconhecida importância e patogenicidade na avicultura industrial são: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* e *Mycoplasma iowae*

Todos esses agentes podem causar doença aparente ou subclínica em galinhas, perus e outras aves. Porém, os MG e MS são agentes de grande importância econômica para a produção avícola, pela severidade da doença respiratória crônica (DRC) das galinhas e sinusite infecciosa dos perus (NASCIMENTO e PEREIRA, 2009).

SILVA (2004) classificou as doenças respiratórias e as diarreias como sendo as principais causas primárias de perdas na qualidade da carne do frango, em diferentes graus de comprometimento.

Em função das perdas econômicas na indústria, MG e MS causam condenação no processamento das carcaças dos frangos por lesões nos sacos aéreos, lotes desuniformes, retardo no crescimento, perdas na produção de ovos, custos com medicação, índice de conversão alimentar negativo e mortalidade variável (KLEVEN, 1998; LEY, 2003).

No Brasil, as normas do PNSA definem as medidas de monitoramento de MG e MS em estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventual, que realizam comércio ou transferência nacional e internacional de ovos embrionados e reprodutores (BRASIL, 2001).

Para realizar o comércio internacional, os estabelecimentos de produção avícola devem estar certificados como livres de micoplasmas, conforme estabelecido no Capítulo IV das normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas. (BRASIL, 2009): *"As normas definem as medidas de monitoramento da micoplasmose em estabelecimentos avícolas de controles*

comércio ou a transferência nacional e internacional de seus produtos, destinados à reprodução e produção de aves e de ovos férteis, ficando os mesmos obrigados a realizarem o monitoramento de seus plantéis, obedecendo às diretrizes do PNSA."

2.2. Epidemiologia e ocorrência de doença respiratória associada à micoplasmas na avicultura do Brasil

A sorologia pelas técnicas previstas pelo PNSA/NPIP fornece informações importantes na vigilância epidemiológica e monitoramento das doenças respiratórias por micoplasmas em diferentes fases do sistema de criação (LEY, 2003). A positividade na SAR para detecção de MG e MS pode somente indicar uma exposição previa ao micoplasma e não uma infeção persistente.

BUIM *et al*. (2006) compararam estirpes de soro e suabes de traqueia inoculadas em meio de Frey em oito lotes de poedeiras comerciais com doença respiratória em uma importante região produtora de ovos no Estado de São Paulo, situada no município de Bastos. Neste estudo, a SAR demonstrou positividade para MG e MS em todos os soros pesquisados, porém as PCRs de detecção específicas para MG e MS demostraram positividade somente para MS. Dos oiyp lotes analisados, em cinco (62,5%) foi diagnosticada coinfecção com MS, pneumovírus e uma estirpe variante do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, também detectadas por PCR. Entretanto, não foi detectada a associação de MG, MS, com o vírus da laringotraqueíte e doença respiratória nas poedeiras em Bastos.

Em outro estudo (CORREZOLA, 2010), a frequência de reações sorológicas para MG em aves de postura comercial no bolsão de avicultura de Bastos foi avaliada. O grande percentual de aves imunizadas que foram reagentes simultaneamente à SAR e ELISA foi de 84,0% e a ausência de sinais clínicos indicaram que houve pouca falha vacinal. Entretanto, quando comparada às aves não vacinadas e hígidas, o índice encontrado foi de 84,3% e não demonstrou ser estatísticamente significante. A elevada sororeatividade simultaneamente à SAR e ao ELISA, observada nas aves não vacinadas, pode ser devida à difusão de estirpes de MG vacinais vivas, que apesar de poderem apresentar grau de patogenicidade variável, poderiam ter se disseminado para as aves não vacinadas.

Em 1988, a vacina viva MG F foi licenciada pela USDA e posteriormente introduzida no Brasil, no início de 1990. Especificamente, foi relatado o seu amplo uso na avicultura do país, entretanto sem um monitoramento prévio do status de MG dos planteis. Isso se deve ao fato de potencialmente conferir boa proteção às aves e deslocar as estirpes de MG selvagens de campo e a estirpe R (METTIFOGO *et al*., 2006b).

Em estudo de lesão em sacos aéreos, foi feita a detecção de MG e *E. coli* (APEC) pela técnica da PCR, correlacionando os resultados com os dados de perdas econômicas pela condenação das carcaças (MACHADO, 2010). O autor encontrou um percentual de associação entre MG e APEC de 17,5% em lotes de frangos do 40 municípios do estado do Rio Grande do Sul. O índice de MG em frangos de corte encontrado por MACHADO (2010) não foi concordante com aquele encontrado por MINHARRO *et al*. (2001) no estado de Goiás, sendo a taxa de detecção de MG e APEC associados à lesão do saco aéreo de 12,9% para os suabes de traqueia colhidos nestes estudos.

Por outro lado, MINHARRO *et al*. (2001), em levantamento das etiologias bacterianas e causas de condenação das carcaça de frangos que apresentavam lesão associadas ao saco aéreo, encontraram 22,3% de positividade para MG pela PCR, que foi concordante ao índice deste agente encontrado por MACHADO *et al*. (2012).

CORREZOLA (2010) afirmou em seu estudo que os elevados índices de sororeatividade no bolsão de Bastos, onde a avicultura comercial é intensa, seria um indicador soro epidemiológico importante e sinal de alerta para a possibilidade das infecções clinica e subclnica por MG. O autor infere também, que o micoplasma pode estar se difundindo entre as granjas, sendo favorecido pelo manejo, adensamento populacional e proximidade entre as propriedades.

Através do seu estudo, CORREZOLA (2010) concluiu que avaliações complementares através do isolamento, caracterização e diferenciação molecular das estirpes de MG circulantes poderiam auxiliar no esclarecimento da epidemiologia da micoplasmose na indústria avícola do nosso meio.

2.3. Transmissão

De uma maneira geral, a transmissão dos micoplasmas ocorre dentre ou entre espécies de hospedeiros estreitamente relacionados evolutivamente, podendo ser transmitidos horizontalmente por aerossóis e constitui assim, uma única fonte de infecção pelo contato direto ave-ave. A transmissão indireta ocorre pelo contato das aves com os tratadores, animais, ração, água e fômites (KLEVEN, 2003).

Pela via vertical de transmissão, MG e MS podem ser disseminados para os ovos, que se infectam ao tocar os sacos aéreos abdominais, após a liberação para o oviduto e antes de atingir o infundíbulo. De maneira subsequente, ocorre a contaminação do oviduto pelo ovo infectado e a infecção de futuros ovos (GLISSON e KLEVEN, 1984; LEY, 2003).

A maior frequência de transmissão *in ovo* ocorre durante a fase aguda da micoplasmose, mas a transmissão também pode ocorrer em uma menor taxa durante a fase crônica da doença (GLISSON e KLEVEN, 1985). Segundo KLEVEN e FLETCHER (1983), os MG e MS não sobrevivem fora do hospedeiro por longos períodos e sobrevivem na palha, borracha e algodão por apenas dois dias ou menos.

As aves de hábitos migratórios constituem potenciais fontes de disseminação da infecção às aves industriais, quando aves-hospedeiras susceptíveis encontrem-se no raio geográfico da rota de migração destas aves que atuam como vetores de transmissão do agente (CHRISTENSEN *et al*., 1994).

2.4. Diagnóstico sorológico e cultivo

No monitoramento sanitário da avicultura e diagnóstico de infecção por MG e MS, os testes sorológicos constituem os primeiros testes de triagem dentre os testes oficiais periódicos nos plantéis de controle obrigatório previsto no PNSA (BRASIL, 2001).

Nos soros analisados pesquisam-se anticorpos pelas técnicas de SAR, IH e ELISA. A SAR constitui técnica rápida, de fácil execução e de baixo custo. Porém, a SAR pode apresentar reações cruzadas com outras espécies de micoplasmas ou reação inespecífica (GLISSON *et al*.,1984) e os resultados fracamente positivos ou indeterminados podem não sinalizar a presença de MG em aves imunossuprimidas (KLEVEN, 1998).

As provas de IH e ELISA são métodos quantitativos de pesquisa de anticorpos e constituem testes confirmatórios das reações sorológicas inespecíficas ou resultados indeterminados no teste de SAR. A alta sensibilidade de IH e ELISA permite diluições sucessivas que aumentam suas especificidades (ROSS *et al*., 1990). No entanto, os testes sorológicos são incapazes de diferenciar os anticorpos de aves vacinadas contra MG daqueles induzidos pelas estirpes selvagens, em animais infectados a campo **(**CZIFRA *et al*.,1993).

As infecções por MG e MS geralmente são confirmadas por isolamento e identificação do agente e detecção do DNA (LEVISOHN E KLEVEN, 2000). As culturas em caldo ou meio seletivos para micoplasmas são feitas dos suabes de traqueias, de fenda palatina e sacos aéreos. De maneira excepcional, outros materiais podem ser usados para o isolamento, como suabes do seio paranasal, cornetos e pulmões (KLEVEN, 1998).

2.5. Detecção de micoplasmas pela PCR

A PCR para detecção de MG é uma técnica mais sensível, específica, rápida que a técnica clássica de cultivo de MG. KEMPF *et al*. (1993) realizaram a comparação a técnica de cultivo de suabes de traqueia com a detecção de parte do genoma (360pb) de MG em galinhas livres de patógenos específicas inoculadas com estirpe MG S6, com o isolamento de 67,3% das estirpes de MG, enquanto que a PCR detectou 97,2% de positividade.

NASCIMENTO *et al*. (1991), propuseram oligonucleotídeos iniciadores de 25 bases para uma PCR específica para detecção de MG (732pb), com resultados satisfatórios na amplificação do DNA de 16 estirpes distintas de MG. Esta PCR demonstrou elevada sensibilidade e especificidade, pois ocorreu detecção de diluições de DNA em até 10^{-6} picogramas e não houve a amplificação do DNA de *Escherichia coli* e nem de outras 16 espécies de micoplasmas aviários.

EL-SHATER *et al*. (1995) utilizaram a PCR para detecção de MG (960pb) e diferenciação de estirpes de micoplasma. Os pares de oligonucleotídeos senso e anti-senso desenhados, de 22 e 23 bases, respectivamente, produziram amplicons que diferenciaram a estirpe de MG S6. Outras espécies de micoplasmas, como *M. oral*, *M arginini*, *M. salivarium* e *M. pneumoniae* não apresentaram genoma amplificado por esta PCR.

Com relação à padronização da técnica de detecção de MG em PCR em tempo real, foi obtida uma melhor sensibilidade de reação no sistema de PCR *Real-Time*. TAYFUN e EYIGOR (2002) demonstraram que, para a PCR *Real-Time*, o limite de detecção para MG teria uma sensibilidade variável de 3 a 3000 UFC/mL^{-1}.

2.6. Diferenciação das estirpes de micoplasmas: caracterização filogenética e genotipagem

OLIVE e BEAN (1999) salientaram a importância da tipagem das estirpes dos micoplasmas na determinação da fonte da infecção, na diferenciação entre as estirpes vacinais e selvagens e principalmente no monitoramento epidemiológico dos programas de vacinação.

A classificação convencional das estirpes do gênero *Mycoplasma* através de critérios fenotípicos é de difícil reprodução em laboratórios de rotina devido às constantes variações antigênicas de algumas espécies do gênero *Mycoplasma* e reações cruzadas entre as elas, gerando constante ambiguidade na diferenciação por estes critérios (POVEDA, 2010).

KHAN *et al*. (1987), THOMAS e SHARP (1988), KLEVEN *et al*. (1998) observaram dentro de uma mesma espécie de micoplasma uma grande heterogeneidade antigênica pela técnica de imunoflorescência. Tal fato também foi observado em eletroforese de proteínas celulares em gel de poliacrilamida, sugerindo suptipos dentro de uma mesma espécie.

LAUERMAN *e al*. (1995), na caracterização filogenética de micoplasmas pela técnica de RFLP, concluíram que a variabilidade na patogenicidade uma estirpe de micoplasma é determinada por um conjunto de fatores como perfil de síntese protéica, componentes glicoprotéicos, fatores de virulência, heterogeneidades antigênica e genética. Portanto, esta técnica demostraria limitações na determinação do grau de patogenicidade de uma estirpe.

GARCIA *et al*. (1995) desenharam pares de oligonucleotídeos para amplificação da região 16S do RNA ribossomal de estirpes de MG, MS e MI visando, posteriormente, diferenciar o genoma amplificado pela RFLP, frente às enzimas de restrição *HPaI* e *MboI*. Em termos práticos, três estipes de micoplasmas de reconhecida patogenidade na indústria avícola foram diferenciadas, entretanto não demonstrou acurácia para explicar a heterogeneidade genética dentro de uma mesma espécie de micoplasma (LAUERMAN *e al*., 1995).

A RAPD foi desenvolvida para a identificação mais específica das estirpes de micoplasmas (FAN *et al.*, 1995). A técnica de RAPD é mais simples, rápida e reprodutível que a RFLP (FAN *et al.*, 1995). GEARY *et al.* (1994) demonstraram ser a RPPD muito útil em estudos epidemiológicos e na identificação de determinados estirpes de MG selvagens de campo.

METTIFOGO *et al*. (2006a) compararam a RAPD e a eletroforese em campo pulsátil (PFGE) na caracterização filogenética de estirpes de MG da avicultura industrial dos Estados de Santa Catarina e Paraná, e obtiveram resultados concordantes com os encontrados por FAN *et al*. (1995), considerando que a RAPD apresenta um potencial satisfatório de tipificação das estirpes de MG em estudos

epidemiológicos relacionados à diferenciação entre as estirpes vacinais e as selvagens de campo. A PFGE foi considerada trabalhosa, dispendiosa e demorada, quando comparada à RAPD.

Outros marcadores moleculares foram sugeridos para o estudo da heterogeneidade genética e epidemiologia molecular das estirpes de MG. LIU *et al*. (2001) estudaram a variabilidade molecular do gene do gene P^VP^A que codifica uma proteína de adesão à membrana celular do MG ao hospedeiro. Variações de tamanho entre os fragmentos obtidos frente à restrição enzimática pela RFLP devido às mudanças de nucleotídeos da região C-terminal do gene P^VP^A formam a base para a diferenciação das estirpes de MG em estirpes vacinais e selvagens de campo.

Além, da caracterização molecular das estirpes de *M. gallisepticum* pela RFLP, a análise filogenética pelo sequenciamento das sequências de nucleotídeos do P^VP^A pode ser utilizada em estudo de epidemiologia molecular ou em surtos epizoóticos de MG (LIU *et al.*, 2001), como também sugerido para outro gene de adesão codificado pela *MGC2* (GHARAIBEH et *al*., 2011).

O sequenciamento da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (IGRS) descrito por LAUERMAN *et al*. (1995), por se tratar de uma sequência altamente variável entre os genomas de micoplasma de espécies diferentes, demonstrou ser uma ferramenta útil na identificação, taxonomia e filogenia das estirpes do gênero *Mycoplasma* (HARASAWA,1999; RAVIV et al., 2007).

GHARAIBEH et *al*., 2011) compararam a análise das sequências de nucleotídeos da região IGRS com a *MGC2* e não observaram diferenças significativas no índice discriminatório entre elas, na tipagem genotípica e diferenciação de estirpes de MG.

A análise da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (IGRS) demonstra um menor percentual de similaridade das sequências de nucleotídeos (76,8 a 88,7%) entre diferentes espécies de micoplasmas.

A região IGRS pode apresentar poucos sítios de polimorfismo nas sequências de nucleotídeos entre estirpes de micoplasma de uma mesma espécie, o que se traduz em pequena variação dessa região dentro de uma mesma espécie de micoplasma, assim tornando a análise da região uma ferramenta útil na tipagem genotípica e epidemiologia molecular das espécies de micoplasma de importância econômica para avicultura (CHALKER e BROWNLIE, 2004; VOLOKHOV *et al*., 2006; RAMIREZ *et al*., 2008).

2.7. Controle dos estabelecimentos avícolas ou núcleos controlados

O controle dos estabelecimentos e núcleos avícolas é fundamentado na erradicação de micoplasma das matrizes e manutenção de seus descendentes em *status* livre do agente pela adoção das medidas de biosseguridade. A aquisição de aves de um dia livres de micoplasmas, separação dos lotes por idade/origem e adoção do sistema all-*in all-out* são métodos gerais que permitem controle das doenças respiratórias nas aves (KLEVEN, 1998; LEY, 2003).

O monitoramento soro-epidemiológico dos plantéis é essencial ao controle e prevenção da micoplasmose por MG e MS. As sorologias para MG e MS constituem o teste primário para o monitoramento e tem sua prática estimulada por programa voluntário de controle sorológico periódico para criadores de aves reprodutoras, como o do *National Poultry Improvement Plan* (NPIP) nos Estados Unidos e PNSA no país (BRASIL, 2001) que ainda provêm: *"Os estabelecimentos e núcleos considerados sob a vigilância e controlados deverão adotar um reforço nas medidas de biosseguridade, tais como estar protegidos por cercas de segurança e com um único acesso, dotado de sistema de lavagem e desinfecção dos veículos, possuir critérios para o controle rígido de trânsito e de acesso de pessoas, ter as superfícies interiores das instalações construídas de forma que permitam limpeza e desinfecção adequadas... Acesso único restrito, com fluxo controlado, com medidas de biosseguridade dirigidas à*

área interna para veículos, equipamentos, material e pessoal...".

Porém, o controle do MG e MS em grandes populações de aves situadas em pequenas regiões geográficas, através da adoção das medidas de biosseguridade e vigilância sorológica, muitas vezes é medida de difícil execução pela grande intensificação das regiões de produção avícola e pode ter um elevado custo (FERGUSON *et al*., 2004).

Nestes casos, a vacinação contra MG é usada como controle em regiões de produção intensificada de ovos, onde a erradicação ainda não é exigida, para reduzir sinais da doença respiratória e atuar na prevenção das perdas da produção de ovos e condenação de carcaça pela aerosaculite (SAIF-EDIN *et al*., 2000).

A vacinação de poedeiras de ovos de consumo é realizada com o objetivo de reduzir os altos custos dos tratamentos com antibióticos e, ao longo prazo, minimizar a transmissão do agente. Existem dois grupos de vacinas no mercado: vacinas inativadas e atenuadas. (FERGUSON *et al*., 2004; METTIFOGO *et al.,* 2006b).

.

A vacina inativada contra MG é amplamente utilizada em vários países (FERGUSON *et al*., 2004). Os resultados dos títulos protetores encontrados com este tipo de vacina são variáveis (HIDELBRAND *et al*., 1983; KARACA e LAM, 1986; KHAN *et al.,* 1986; KARACA e LAM, 1987). Estudos realizados por GLISSON e KLEVEN (1984) citados por EVANS *et al*. (1992) demonstraram que houve proteção contra a perda na produção de ovos.

Entretanto, as vacinas inativadas protegem contra a infecção por algumas estirpes de MG selvagens de campo, e ainda não proporcionaram uma efetiva proteção universal contra a doença respiratória por micoplasmas (GLISSON e KLEVEN, 1985; ABD-EL-MOTELIB e KLEVEN, 1993).

A vacina viva contra MG é permitida em poedeiras, mas em reprodutores está proibida no Brasil, por prejudicar o diagnóstico e principalmente, o monitoramento sorológico e epidemiológico da micoplasmose nos reprodutores (BRASIL, 2001).

A eficiência das vacinas vivas contra MG reside no estímulo da resposta imune celular, humoral; e na exclusão competitiva da estirpe selvagem a campo pela colonização de uma outra estirpe de menor virulência (LEVISOHN e KLEVEN, 1981; KLEVEN *et al*., 1998).

A relação complexa entre virulência, patogenicidade e imunogenicidade entre as estirpes vacinais vivas contra MG existentes no mercado são observadas na prática (LEVISOHN, 1984). De maneira geral, LIN e KLEVEN (1984), citados por ABD-EL-MOTELIB e KLEVEN (1993), relataram que níveis de anticorpos protetores estão diretamente correlacionados com a virulência da estirpe de MG utilizada na vacina.

A vacina viva elaborada a partir da estirpe MG F é de uso extensivo e mundial (LEY, 2003), sendo considerada mais virulenta que vacinas das estirpes 6/85 e ts-11 (EVANS e HAFEZ, 1992).Porém, a estirpe F parece ser a que fornece títulos aceitáveis de anticorpos protetores às aves (RODRIGUEZ e KLEVEN, 1980; BRANTON *et al*., 1988; ABD-EL-MOTELIB e KLEVEN, 1993).

2.8. Aspectos clínicos e patogênese

Os sintomas clínicos de infecção por MG e o agravamento da severidade dos sinais em galinhas e perus são geralmente de etiologia que envolve infecções concomitantes com outros agentes e fatores ambientais (LEY, 2003; KLEVEN, 1998;).

A infecção por MS aparece na forma subclínica com baixo impacto nos índices produtivos para aves adultas e causa sinovite e artrite em matrizes pesadas. A progênie do lote afetado por MS parece constantemente afetada, com elevado índice de descarte em função de lesão de sacos aéreos, índice de conversão alimentar negativos e redução no ganho de peso (METTIFOGO *e*t *al.,* 2006b).

As infecções por agentes vírais respiratórios, como doença de Newcastle, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, laringotraqueite infecciosa e influenza aviária; vírus imunodepressores, como o vírus da anemia infecciosa das galinhas, bactérias (MS e

Escherichia coli patogênica para aves - APEC); fatores ambientais, como estresse, baixa temperatura e presença de amônia podem atuar sinergicamente no agravamento e severidade da DRC (GROSS, 1990; NAYLOR *et al*., 1992; NAKAMURA *et al.*, 1994).

Em aves jovens e/ou imunossuprimidas, os sinais podem se manifestar por tosse, conjuntivite, com ou sem colabamento das pálpebras, secreção nasal de natureza serosa e estertores respiratórios (KLEVEN, 2003). As aves diminuem progressivamente o consumo de ração e o índice de conversão alimentar fica negativo (NASCIMENTO e PEREIRA, 2009).

A maioria dos micoplasmas adere fortemente ao epitélio dos tratos respiratório e urogenital, glândula mamária e membrana sinovial das células do hospedeiro. A adesão à célula do hospedeiro começa com o primeiro contato inespecífico entre MG aos receptores de membrana da célula alvo, posteriormente o MG se liga aos receptores específicos, para então, ocorrer a colonização propriamente dita e subsequentes danos bioquímicos à célula do hospedeiro (LEVISOHN, 1984; RAZIN e JACOBS, 1992).

Embora a adesão de micoplasma às células alvo do hospedeiro, a fusão "célula-célula" das membranas e a variação antigênica das estirpes sejam fatores importantes para a colonização e infectividade do MG, o estado de imunossupressão das aves, sinergismo com outros agentes e fatores ambientais, devem ser avaliados em conjunto na patogênese da micoplasmose (RAZIN *et al*., 1998).

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-MOTELIB, T.Y.; KLEVEN, S.H. A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. *Avian Diseases*, v. 37, n. 4, p. 981-987, 1993.

BRADBURY, J.M. Recovery of Mycoplasmas from Birds. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds.) *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v, 104, p. 45-51.

BRANTON, S.L.; LOTT, B.D.; DEATON, J.W. *et al*. F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccination of post-production peak commercial leghorns and its effect on egg and eggshell quality. *Avian Diseases*, v.32, n. 2, p. 304-307, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa DAS/nº44 de 23 de agosto de 2001. Aprova sobre as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Micoplasma meleagridis*), em conformidade com os Anexos a essa Instrução Normativa. Diário Oficial da União. In: MANUAL de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Brasília, Distrito Federal. 2009. p. 234-240.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº193 de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, Distrito Federal. 2001, Seção 1, p.13.

BUIM, M.R.; GUASTALLI, E.A.L.; TOGASHI, C.K. *et al*. Micoplasmose aviária e associações patológicas em aves de postura comercial. *Instituto Biológico*, v. 68, Suplemento, p. 131-133, 2006.

CHALKER, V.J.; BROWNLIE, J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 537–542, 2004.

CORREZOLA, L. M. Frequência de reações sorológicas para *Mycoplasma gallisepticum* em aves de postura de granjas comerciais localizadas no Estado de São Paulo. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente, Instituto Biológico, São Paulo, São Paulo.

CRISTENSEN, N.H.; YAVARI, C.A.; MCBAIN, A J. *et al*. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae*

on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathology*, v. 23, n. 1, p. 127-143, 1994.

CZIFRA, G.; SUNDQUIST B.; TUBLOLY T. *et al*. Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked imunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Diseases*, v. 37, n. 3, p. 680-688, 1993.

EL-SHATER, S.A.A.; EBIARY, E.A.; ESSIA, S.A. *et al.* Direct detection of *Mycoplasma gallisepticum* (S6 strain) by polymerase chain reaction. *Assiut-Veterinary-Medical Journal*, v. 32, n. 64, p. 102-109, 1995.

EVANS, R.D.; HAFEZ, Y.S. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting recuced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Diseases*, v. 36, n. 2, p. 197-201, 1992.

EVANS, R.D.; HAFEZ, Y.S.; ORTHEL, F.W. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination-challenge: an egg-production model. *Avian Diseases*, v. 36, n. 4, p. 956-963, 1992.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum. Avian Diseaese*, v. 39, p. 729-735, 1995.

FERGUSSON, M.M.; LEITING, V.A.; KLEVEN, S.H. Safety and efficacy of the avirulent *Mycoplasma gallisetpticum* strain K5054 as live vaccine in poultry. *Avian Diseases*, v.48, n. 1, p. 91-99, 2004.

GHARAIBEH, S.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R. *et al*. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan. *Avian Diseases*, v. 55, n. 2, p. 212-216, 2011.

GARCIA, M.; JACKWOOD, M.W.; HEAD, M. *et al.* Use of species specific of oligonucleotide probes todetect *Mycoplasma gallisepticum*, *M.synoviae* and *M.iowae* PCR amplification products. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, n. 1, p. 56-63, 1995.

GEARY, S.J.; FORSYTH, M.H.; ABOUL-SAOUD, S.*et al*. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes*, v. 8, n. 4, p. 311-316, 1994.

GLISSON, J. R.; DAWE, J. F.; KLEVEN, S. H. The effect of oil emulsion vaccines on the occurrence on nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and Mycoplasma synoviae. *Avian Diseases*, v. 28, n. 2, p. 397-405, 1984.

GLISSON, J. R.; KLEVEN, S. H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: effects on egg transmission and egg production. *Avian Diseases*, v. 28, n. 2, p. 406-415, 1984.

GLISSON, J. R.; KLEVEN, S. H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: further studies on egg transmission and egg production. *Avian Diseases*, v. 29, n. 2, p. 408-415, 1985.

GROSS, W. B. Factors affceting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Diseases*, v. 34, n. 3, p. 607-610, 1990.

HARASAWA, R. Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S RNA spacer sequence. *Microbiology and Immunology*, v. 43, n. 2, p. 127-132, 1999.

HIDELBRAND, D.G.; PAGE, D.E; BERG, J.R. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) -laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Diseases*, v. 27, n. 3, p. 792-802, 1983.

HUTCHISON, C.A.; PETERSON, S.N., GILL, S.R. *et al*. Global transposon mutagenesis and a minimal mycoplasma genome. *Science*, v. 5447, n. 286, p. 2165-2169, 1999.

KARACA, K.; LAM, K. M. Effect of temperature-sensitive *Mycoplasma gallisepticum* vaccine preparations and routes of inoculation on resistence of white leghorns to challenge. *Avian Diseases*, v. 30, n. 4, p. 772-775, 1986.

KARACA, K.; LAM, K.M. Efficacy of commercial *Mycoplasma gallisepticum* bacterin

(MG-Bac) in preventing air-sac lesions in chickens. *Avian Diseases*, v. 31, n. 1, p. 202-203, 1987.

KEMPF, I.; BLANCHARD, A.; GESBERT, F. *et al*. The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Avian Pathology*, v. 22, n. 1, 739-750, 1993.

KHAN, M.I., LAM, K.M.; YAMAMOTO, R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Diseases*, v. 31, n. 2, p. 315-320, 1987.

KHAN, M.I.; MCMARTIN, D.A.;YAMAMOTO, R *et al*. Observations on comercial layers vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* bacterin on a multiple-age site endemically infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v.30, n. 2, p. 309-312, 1986.

KLEVEN, S.H.; FAN, H.H.; TURNER, K.S. Pen trial studies on the use of live vaccines do displace virulent *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Diseases*; v. 42, n. 2, p. 300-306, 1998.

KLEVEN, S.H.; FLETCHER, W.O. Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, v. 27, n. 1, p. 308-311, 1983.

KLEVEN, S.H. Mycoplasma in the etiology of multifactorial respiratory diseases. *Poultry Science*, v. 77, n. 8, p. 1146-1149, 1998.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M. *et al*. (Eds.) *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 2003. 11 ed., p. 719-721.

LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A. *et al*. Avian Mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, v. 39. n. 4, p. 804-811, 1995.

LEVISOHN, S. Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chicken trachea as related to pathogenicity and immunogenicity. *Israel Journal of Medical Science*, v. 20, n. 10, p. 982-984, 1984.

LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 19, n. 2, p. 425-442, 2000.

LEVISOHN, S.; KLEVEN, S.H. Vaccination of chickens with nonprathogenic *Mycoplasma gallisepticum* as a means for displacement of pathogenic strain. *Israel Journal of Medical Science*, v. 17, n. 7, p. 669-670, 1981.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A. M. *et al*. (Eds.). 11 ed. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press. 2003, p. 722-744

LIN, M.Y.; KLEVEN, S. H. Evaluation of attenuated strains of *Mycoplasma gallisepticum* as vaccines in young chickens. *Avian Diseases*, v. 28, n. 1, p. 88-89, 1984.

LIU, T.; GARCÍA, M.; LEVISOHN, S. Molecular variability of the adhesin-encoding gene pvpA among *Mycoplasma gallisetpticum* strains and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 5, p. 1882-1888, 2001.

MACHADO, L.S; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V. L. A. *Mycoplasma gallisetpicum* as risk fator on weight of borilers condemnated with airsacculitis by Federal Sanitary Inspection. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 7, p. 645-648, 2012.

MACHADO, L.S. PCR na detetcção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* patogênica em frangos de corte com aerossaculite pela Inspeção Sanitária Federal. 2010. 63p. Dissertação (Mestrados) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, RJ.

MANILOFF, J. Evolution of wall-less prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 477499, 1983.

METTIFOGO, E; BUZINHANI, M.; BUIM, M.R. *et al*. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil. *Journal of Veterinary Medicine B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 53, n. 9, p. 445-450, 2006.

METTIFOGO, E.; FERREIRA, A.J.P. Micoplasmose aviária. In: ANREATTI FILHO, R. L. (Ed.). Saúde aviária. São Paulo: Roca, 2006. p. 147-151.

MILES, R.J. Catabolism in molicutes. *Journal of General Microbioogy*, v. 138, n. 9, p.1773-1783, 1992.

MILES, R.J.; TAYLOR, R.R.; ABU-GROUN, E.A.M. Diversity of energy-yielding metabolism in *Mycoplasma* spp. *International Organization for Mycoplasmology Letters*, v. 3, n.10, p. 165-166, 1994.

MILES, R.J.; TAYLOR, R.R.; VARSANI, H. Oxygen uptake and H_2O_2 production by fermentation by fermentative *Mycoplasma* spp. *Journal for Medical Microbiology*, v. 34, n. 4, p. 219-223, 1991.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A. *et al.* Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de saco aéreo em frangos abatidos no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.

MUSHEGIAN, A.R., KOONIN, E.V. 1996. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 17, p. 10268-10273, 1996.

NAKAMURA, K.; UEDA, H.; TANIMURA, T. *et al*. Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection. *Journal of Comparative Pathology*, v. 111, n. 1, p. 33-42, 1994.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. *et al*. (Ed). *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009, p. 485-502.

NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K.R. *et al*. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Disease*, v. 35, n. 1, p. 62-69, 1991.

NAYLOR, C.J.; AL-ANKARI, A.R.; AL-AFALEQ, A.I. *et al*. Exacerbation *of Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. *Avian Pathology*, v. 21, n. 2, p. 295-305, 1992.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

POLLACK, J.D. Carbohydrate metabolismo and energy conservartion in Mycoplasmas: molecular biology and pathogenis. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R. *et al*. (Eds). Columbia, Washington: *American Society for Microbiology*, 1992. p. 181-200.

POVEDA, J.B. Biochemical characteristics in Mycoplasma identification. In: MILES, R.; NICHOLAS, R. (Eds). *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 69-78.

RAMIREZ, A.S.; NAYLOR, C.J.; PITCHER, D.G. *et al*. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 4 p.279–287, 2008.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N. *et al*. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological

studies. *Avian Diseases*, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Mycoplasma adhesion. *Journal of General Microbiology*, v. 138, n. 3 p. 407-422, 1992

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REVISED minimum standards for the description of new species of the class *Mollicutes* - Division *Tenericutes* (1995). ICSB - International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, v. 45, p. 605-612.

RODRIGUEZ, R.; KLEVEN, S.H. Patthogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. *Avian Diseases*, v. 24, n. 4, p. 800-807, 1980.

ROSENGARTEN, R.; BEHRENS, A.; STETEFELD, M. *et al*. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane-surface proteins. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 11, p. 5066-5074, 1994.

ROSENGARTEN, R.; YOGEV, D. Variant colony surface antigenic phenotypes within Mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 149-158, 1996.

ROSS, T.; SLAVIK, M.; BAYARI, G. *et al*. Elimination of Mycoplasmal plate agglutination cross-reaction in sera from chickens inoculated with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, v. 34, n. 3, p. 663-667, 1990.

SAIF-EDIN, M.; ALY, M.; MOUSA, S. Field evaluation *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in broiler breeder chickes. In: SCIENCE CONFERENCE, 9ª, 2000, Egito. *Anais*… Assiut: Faculty of Veterinary Medicine.

SILVA, E.N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frango. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, XIII, 2004, Santos. *Anais*... Botucatu: FACTA, v. 2, p. 193-199.

SIRAND-PUGNET, P., CITTI, C., BARRE, A. *et al*. Evolution of Mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in. Microbiology*, v.158, n. 10, p. 754-766, 2007.

TAYFUN, K.C.; EYIGOR, A. Real Time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. Avian Disease, n. 47, p. 712-717, 2002.

TAYLOR, R.R.; MOHAN, K.; MILES, R.J. Diversity of energy-yielding substrates and metabolism in avian micoplasmas. *Veterinary Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 291-304, 1996.

THOMAS, C.B.; SHARP, P.T. Detection of antigenic variation among strains of *Mycoplasma gallisepticum* by enzyme-linked immunosorbent and western blot analysis. *Avian Diseases*, v. 32, n. 4, p. 748-756, 1988.

VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X. *et al*. Sequencing of the intergenic 16S–23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 5, p. 680–698, 2006.

WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L. *et al*. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriol*ogy, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; LUDWIG, W. *What are mycoplasmas*: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v. 21, n. 4, p. 305–316, 1984.

YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON, M. R. *et al*. Molecular basis of mycoplasma surface antigenic variation a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutations of periodic coding region and 5' regulatory

sequences. *The EMBO Journal*, v. 10, n. 13, p. 4069-4079, 1991.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

O presente trabalho objetiva-se em determinar a ocorrência de micoplasmas em galinhas industriais pela relação da evolução molecular entre as estirpes.

4.2. Específicos

4.2.1 - Identificação espécies e subtipos clonais caracterizar;
4.2.2 - Comparação genotípica das estirpes de micoplasmas;
4.2.3 - Determinação o perfil epidemiológico-molecular de ocorrência dessas estirpes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Locais de realização do experimento

O projeto foi realizado no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária e de Biodados do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

5.2. Amostragem

Foram utilizadas 122 amostras de traqueia de aves industriais coletadas ao abate, sendo 71 de poedeiras do estado de Minas Gerais (lotes 1, 2 e 3), 12 de poedeiras do estado do Espírito Santo (lote 4), 21 amostras de frango de corte do Estado de Minas Gerais (lote 5 e 6) e 18 amostras de reprodutores do estado de Minas Gerais (lote 4), conforme a Tabela 2.

5.3 Pré-enriquecimento dos suabes de traqueia em caldo

Os suabes da traqueia coletados foram preparados para o pré-enriquecimento em fluxo laminar no Setor de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG e foram agrupados em poedeiras (P), reprodutores (R), e frangos de corte (FC).

Os suabes foram imergidos em 1,5 mL de caldo de Frey estéril, segundo TULLY (1995a), que continha vermelho de fenol como indicador de pH (7,2-7,4). O material foi incubado por até 144h em condições de microaerofilia a 37^{o}C ou até a viragem do pH. A modificação da cor pela acidificação ou alcalinização do meio foi o indicativo do crescimento do micoplasma, observadas a cada 24 horas. O caldo foi filtrado em membrana Millipore® de 0,45 µm de poro (TULLY, 1995b) e a ausência de micro-organismos aeróbios foi confirmada em placa de sangue desfibrinado, incubadas por 24h a 37 ^{o}C.

Como controle positivo do crescimento bacteriano foram utilizadas estirpes comerciais de vacinas vivas de MG (*MGF-Vax* e MG70-*MycoGalli*), respectivamente uma estirpe americana e brasileira, das empresas *Schering Plough*® (Kenilworth, New Jersey) e *Biovet*® (Vargem Grande Paulista, São Paulo).

5.4. Extração do DNA das amostras de suabes de traqueia, vacinas e antígenos coloridos para SAR

A extração e purificação do DNA genômico de controles positivos das PCR e suabes diretos das mucosas das traqueias foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1) segundo SAMBROOK *et al*. (2001) e BASHIRUDDIN (2010).

Em microtubos de 2000 µL, foram adicionados 500 µL de PBS 160mM a 500 µL de meio de Frey e 100 µL de suspensão do material ou suabes diretos das traqueia e vortexados durante 10 segundos. Os microtubos foram centrifugados a 14.000*g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem foi realizado por mais duas vezes, pela adição de 500 µL de PBS e centrifugação a 14.000*g* durante 10 minutos.

Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) em tampão TNE: Tris-HCl 10mM, pH 8,0, 1mM NaCl, 1M de EDTA. Após os microtubos serem incubados a 56ºC durante 15 minutos, foram adicionados ao lisado um mesmo volume de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Então a suspensão foi homogeneizada por inversão durante 15 minutos e depois o mate

Tabela 2. Características das amostras provenientes de segmentos da atividade avícola dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, no período de maio/2011 a outubro/2012.

Lote	Número de amostras	Procedência	Tipo de ave	Capacidade de ocupação	Circulação da vacina MG	Material coletado	Sinais clínicos da DRC	Sintomas	Idade	Tratamento
1	10	Itanhandu//MG	poedeira	8.000.000	NI	traqueia e corneto	Sim	Respiratórios, espessamento de sacos aéreos, SAR + p/MG	62 semanas	Eliminação do lote
2	17	Itanhandu/MG	poedeira	8.000.000	NI	suabe de traqueia	Não	Normais, SAR - p/*MG*	70 semanas	NA
3	44	Igarapé/MG	poedeira	16.000	Sim/MG70	traqueia	Não	Normais, SAR + p/*MG*	53 semanas	NA
4	12	NI/ES	poedeira	NI	Não	suabe de traqueia	Sim	Respiratórios, SAR + p/*MG*	49 dias	Eliminação do lote
5	12	Pará de Minas/MG	frango de corte	150.000	Não	traqueia	Sim	Respiratórios, SAR - p/*MG*	4 dias	Eliminação do lote
6	9	Igaratinga/MG	frango de corte	NI	Não	traqueia	Sim	Respiratórios e prostração 72h após vacina VBIG, hemorragia difusa na mucosa traqueal	12 dias	Enrofloxacina na àgua do bebedouro
7	18	Igarapé/MG	reprodutor	20.000	(?)	traqueia e pulmão	Sim	Esudato nasal, região periocular e nasal edemaciada, SAR - p/*MG*	28 semanas	Vacinação do lote contra MG (?)

NI=Não informado; SAR=Soro aglutinação rápida em placa; VIBIG=Vírus da bronquite infecciosa das galinhas; NA=Não se aplica; DRC=Doença respiratória complicada, (?)=Suspeita de circulação de estirpe de micoplasma vacinal.

rial foi centrifugado a 14.000*g* durante 30 minutos.

O DNA foi precipitado da fase aquosa pela adição de 100µL de acetato de amônia a 8mM e mantidos durante 15 minutos em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Os microtubos foram centrifugados em 14.000*g* durante 5 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Foram adicionados 420 µL de isopropanol a 6ºC. O *pellet* resultante foi lavado em 800 µL de álcool etílico a 80% e eluído em 25µL de TE.

Conforme a Tabela 3, para cada ensaio foi utilizado como controles positivo o DNA extraído de vacinas e antígenos coloridos comerciais para SAR.

5.5. Extração do DNA das amostras pré-enriquecidas

O DNA das amostras pré-enriquecidas em caldos foi extraídos pelo método de fervura-congelamento rápidos padronizado pela OIE (2004) e adaptado por BASHIRUDDIN (2010). Em microtubos cônicos de 1500 µL, 200 µL de meio de cultura pré-enriquecido foram centrifugados a 14.000*g* durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4^{o}C.

O *pellet* foi lavado em 200 µL de PBS, então o sobrenadante descartado, e o *pellet* foi resuspendido em 200 µL de PBS e novamente centrifugados a 14.000*g* durante 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendido em 25 µL de água ultrapura 18 MΩ. A suspensão foi fervida em termobloco a 99°C durante 10 minutos e imediatamente congelada a -20°C. O DNA molde foi separado do sedimento por centrifugação a 14.000*g* durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

5.6. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA total das amostras

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas na $DO_{260/280}$ por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 1000®, *Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific*, VA EUA). O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do ge

noma do micoplasma ou estocado a -20^{o}C em momento do uso.

Tabela 3. Identificação das vacinas e antígenos co loridos para SAR utilizados como controles posi tivos.

Nome	**Tipo**	**Nome/ Laboratório/ Origem**	**Estirpe do *Mycoplasma***
BRA/ MG70 VAC1	Vacina/A	MG70-MycoGalli®/ Biovet/Vargem Grande Paulista, São Paulo	*M. gallisepticur*
EUA/ MGR/ VAC2	Vacina/I	MG-BAC®-R890/ Fort Dodge, Iowa	*M. gallisepticur*
BRA/ MGF/ VAC3	Vacina/A	MGF-Vax®/ Schering Plough/Kenilworth, New Jersey	*M. gallisepticum (F)*
JAP/R EF1	Antígeno colorido	Não informado/Japão	*M. gallisepticum*
JAP/R EF2	Antígeno colorido	Não informado/Japão	*M. gallisepticu (S6)*
BRA/ REF3	Antígeno colorido	Salsbury®//Campinas, São Paulo	*M. synoviae*

A=atenuada; I=inativada, VAC=vacina; REF=referência

5.7. Padronizaçao da PCR

5.7.1 Iniciadores

Os amplicons esperados para o genoma de micoplasmas aviários, dos quais podem variar de 178 a 2488 pares de bases (Tabela 4), foram amplificados aleatoriamente na primeira reação e sequenciados os produtos dos oligonucleotídeos universais, após uma segunda reação, com a finalidade de amplificar a região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (16S-23S IGRS) descritos por LAUERMAN et al. (1995), respectivamente, IGRS F: 5'-GTAGGCCGGTGATTGGAGTTA-3'e IGRSR: 3'-TAGGGCCGGTGATTGGAGTTA-5'.

5.7.2 Concentração de reagentes

Uma alíquota de 1,0 µL de cada amostra de DNA total, diluído na concentração de 200ng/µL, foi utilizada como molde na reação de amplificação em um volume final de 50µL: 10,0µL de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl - *Invitrogen*), 1,0µL de

dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - *Invitrogen*), 4,0 µL de $MgCl_2$ a 50mM (I*nvitrogen*), 0,50µL de cada iniciador a25pmol, 0,25µL de Taq Polimerase a 5U/l (*Taq*DNA Polymerase – *Phoneutria*®) e água ultrapura (18 MΩ) q.s.p.

5.7.3 Curva de calibração da temperatura ótima de anelamento

A PCR foi realizada em termociclador (*Axygen-Maxygene/*EUA). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de 94ºC por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, cada ciclo com desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 55ºC por 30 segundos e extensão a 72ºC por 60 segundos; sendo um ciclo de extensão final a 72ºC por 5 minutos, também, de acordo com LAUERMAN e al. (1995).

5.7.4 Reprodutibilidade

Com as concentrações dos reagentes pré-estabelecidas e utilizando 55^{o} como temperatura de anelamento, foram realizadas três repetições em dias alternados.

5.7.5 Sensibilidade e especifidade

Este teste foi realizado com o objetivo de se estabelecer o limite e especificidade na detecção de DNA nas amostras. As estirpes vacinais e de antígenos coloridos para SAR foram utilizadas com controle positivo neste experimento, bem como uma estirpe de *Escherichia coli* e água ultrapura como controles negativos. O DNA obtido pelo método de fervura foi quantificado em espectofotômetro NanoDrop 1000® utilizando o comprimento de onda de 260nm. A seguir, fora realizadas diluições decimais do DNA extraído de cada cepa em água ultrapura estéril, partindo de 1µg até 1fg DNA/µL.

5.8. Análise dos produtos amplificados

A visualização dos resultados das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Em cada 5,0µL do produto amplificado foi adicionado 1,0µL do tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol) na concentração de 5X, e essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1%. A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico) e foi utilizado padrão molecular de 100pb DNA ladder (*Invitrogen*®). Posteriormente à corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo na concentração de 10 mg/mL e os resultados foram revelados com o auxílio de um transiluminador UV.

5.9. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel* and PCR *Clean – UP System*® (*Promega*), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (*NanoDrop* 1000®).

Para determinar a eficiência da purificação, 1,0 µL de cada produto foi homogeneizado com 1,0 µL de tampão corante de amostra e em seguida analisado por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X à temperatura ambiente sob voltagem constante de 100V. O DNA purificado de cada amostra foi estocado a –20ºC até o momento do sequenciamento.

5.10. Sequenciamento genético

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al*. (1977), em um sequenciador automático capilar (MegaBace® 1000, *HEALTHCARE*®) e foi utilizado o *Kit DyEnamic*™ ET *DyeTerminator* (*Amersham Bioscience*®), conforme recomendações do fabricante.

5.11. Reação de sequenciamento

Para a realização das reações de sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático capilar Mega Base 1000 (HEALTHCARE®) do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária (UFMG).

Uma alíquota de 100 ng do amplicon purificado de cada amostras foi utilizada em cada reação de sequenciamento individual, as quais foram feitas em placa de 96 poços, em termociclador (*Eppendorf* 96-well Mastercycler®), com a seguinte ciclagem: desnaturação a 95ºC por 1

minuto, anelamento do iniciador a 55ºC por 15 segundos, extensão a 72ºC por 3 minutos, sendo esse ciclo repetido por 40 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando isopropanol 40% e etanol 65% e homogeneizado em tampão de amostra

5.12. Análise das sequências

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa Phred (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/), que aceita como critério de validação de qualidade somente as leituras que tenham pontuação de no mínimo de Phred 20, que corresponde a aproximadamente 99% de certeza da base indicada. O sequenciamento de todas as repetições de cada amostra foi utilizado para a montagem e visualização das sequências consenso final com a utilização da ferramenta CAP3 do Phred (EWING e GREEN, 1998).

5.13. Comparação das sequências

Todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). O algoritmo BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo NCBI foi utilizado para a busca de similaridade entre os nucleotídeos (ALTSCHUL *et al*., 1997).

5.14. Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram feitas com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*® (MEGA 5.0/ www.megasoftware.net) versão 5.0 para *Windows* e *MultAlin* (http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html). Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente usando versão 7.0 do *Bioedit* (HALL, 1999).

5.15. Estudo filogenético

Árvores filogenéticas foram construídas a partir dos alinhamentos de sequências de nucleotídeos dos amplicons com auxílio do programa MEGA® 5.0 (www.megasoftware.net). Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança da topologia "bootstrap" com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas.

5.16. Cálculo das distâncias filogenéticas

Considerando que transições e transversões das bases ocorrem com igual probabilidade e comparando as sequências duas a duas foram obtidos os percentuais de caracteres distintos ou dissimilares entre as amostras. Esses resultados correspondem a matriz de distâncias em números relativos. Matrizes semelhantes, com grandezas proporcionais foram obtidas pela execução do programa Clustal-W e ProtDist do MEGA 5.0, do pacote *Compute Pairwise Distances* (KIMURA, 1989; TAMURA *et al*., 2011).

5.17. Criopreservação das estirpes de micoplasmas

Após o pré-enriquecimento, as estirpes caracterizadas através do sequenciamento das sequências de nucleotídeos alvo foram devidamente identificadas e classificadas. As estirpes foram estocadas em meio de Frey na concentração final de glicerol a 5% (v/v) e congeladas a -80^{o}C, conforme descrito por RAVIV *et al*. (2007), com objetivo de serem purificadas para utilização em estudos posteriores.

Tabela 4. Espécies de micoplasmas aviários e o tamanho molecular da região 16S-23S IGRS[1]

Espécie	Estirpe	Produto (pb)
M. anatis	1340	269
M. anseris	1219	178
M. buteonis	BbT2g	294
M. cloacale	383	191
M. columbinasale	694	341
M. columbinum	MMP1	330
M. columborale	MMP4	382
M. corogypsi	Bv1	302
M. falconis	H/T1	191
M. gallinaceum	DD	285
M. gallinarum	PG16	305
M. gallisepticum	PG31	645
M. gallopavonis	WR1	292
M. glycophilum	486	299
M. gypis	B1/T1	226
M. imitans	4229	2488
M. iners	PG30	308
M. iowae	695	224
M. lipofaciens	R171	303
M. melegridis	17529	289
M. pullorum	CKK	298
M. sturni	UCMF	264
M. synoviae	WVU1853	308

Adaptado de RAMIREZ *et al.*(2008); 1=Re gião transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal .

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER, A. A. *et al*. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BASHIRUDDIN, J.B. Extraction of DNA from Mycoplasma. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds). *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v, 104, p. 141-144.

EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, n. 3, p. 186-194, 1998.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequencer alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, n.4, p. 95-98, 1999.

KIMURA, M.A. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1989.

LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A. *et al*. Avian Mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, v. 39. n. 4, p. 804-811, 1995.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. In: AVIAN mycoplasmosis - *Mycoplasma gallisepticum* (2004). 5 ed. Paris: OIE Biological Standards Commission. 2004. v. 2, cap. 2.7.3, p. 842-855.

RAMIREZ, A.S.; NAYLOR, C.J.; PITCHER, D.G. *et al*. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 4 p.279–287, 2008.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N. *et al*. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases*, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning* a laboratory manual. In: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. 3. ed. New York: Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2, cap 8, p. 818-896.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p.5463-5467, 1977.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al*. MEGA5: molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of molicutes: molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. In: RAZIN, S; TULLY, J. G., (Eds.) *Molecular characterization*. San Diego: Academic, 1995. v. 1, p. 33-39.

TULLY, J.G. Cloning and filtration tecnhiques for mycoplasmas: mycoplasma. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995b, v. 1, p. 173-177.

CAPÍTULO I

TIPAGEM GENOTÍPICA E DINÂMICA DO CULTIVO DE MYCOPLASMAS ORIUNDOS DE AVES INDUSTRIAIS

[*Genotyping and determination of kinetic parameter of substrate utilization by Mycoplasmas in chickens of the poultry industry - Brazil*]

RESUMO

Cinquenta e quatro estirpes de bactérias do gênero *Mycoplasma* foram obtidas após o pré-enriquecimento em caldo de Frey, contendo glicose, e L-cisteína e soro equino, durante 144 horas a 37^{o}C. Uma das estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* obtidas neste estudo foi detectada somente pela PCR não e cresceu no meio de Frey. Foram obtidas sequências de nucleotídeos de estirpes obtidas de quatro lotes de galinhas de postura (n=83), dois lotes de frangos de corte (n=21) e um lote de reprodutores (n=18). Seis estirpes sequenciadas de nucleotídeos foram obtidas de vacinas e antígenos coloridos. A tipagem genotípica das estirpes da avicultura industrial, vacinais e antígenos foi feita por análise da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (16S-23S IGRS), não codificadora do DNA do gênero *Mycoplasma*. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências de estirpes de micoplamas disponibilizadas no GenBank: PG31, *Mycoplasma gallisepticum* (MG); WVU1853, *M. synoviae (*MS); 17529, *M. meleagridis* (MM), 695, *M. iowae* (MI); PG16, *M. gallinarum* (MGN); PG30, *M. iners* (MIN); DD, *M. gallinaceum* (MGC); CKK, *M. pullorum* (MP); 486, M. *glycophilum* (MGL). Foram obtidos os seguintes percentuais genotípicos das estirpes de micoplasma: 27,8% de MGN; 20,4% de MIN; 18,5% de MP; 18,5% de MG; 11,1% de MGC; 3,7% de MGL; 0% de MM e 0% de MI. Os resultados obtidos com a análise filogenética demonstraram que as estirpes deste estudo apresentaram similaridade com estirpes padrão de micoplasmas aviários dos grupos filogenéticos Pneumoniae ou Hominis e que foram previamente descritas em galinhas (*gallus gallus domesticus*).

ABSTRACT

Fifty-four isolates of genus *Mycoplasma* were pre enriched in Frey medium, containing glucose and L-cysteine for 144 hours at 37oC. A *Mycoplasma gallisepticum* strain did not grow up in Frey's broth. Nucleotide sequences strains were obtained from four flocks of laying hens, one flock of breeders and two flocks of broiler chickens (n=122). Six nucleotides sequences were obtained from commercial vaccines and antigens. The genotyping of poultry industry strains and vaccine antigens was done by analysis of the transcribed region of the intergenic space between 16S and 23S ribosomal RNA (16S-23S IGRS), non-coding DNA of *Mycoplasma*. The nucleotide sequences obtained were compared with sequences available from other micoplamas strains in GenBank: PG31, *Mycoplasma gallisepticum* (MG); WVU1853 *M. synoviae* (MS); 17529, *M. meleagridis* (MM); 695, *M. iowae* (MI); PG16, *M. gallinarum* (MGN); PG30, *M. iners* (MI); DD, *M. gallinaceum* (MGC); CKK, *M. pullorum* (MP); 486, *M. glycophilum* (MGL). We obtained the following percentages of types of genotypic strains of mycoplasma: MGN 27.8%, 20.4% MIN, 18.5% for MP, 18.5% of MG; 11.1% of MGC; 3 7% of MGL; 0% 0% MM and IM. The results obtained with phylogenetic analysis showed that the strains of this study showed similarity with standard strains of avian mycoplasma of Pneumoniae or Hominis phylogenetic groups that were previously described in chickens (*Gallus gallus domesticus*).

1.INTRODUÇÃO

A identificação das espécies de micoplasmas é feitas pela combinação das características morfológicas, bioquímicas e sorológicas das colônias (BROWN *et al*., 2007).

A classificação convencional das estirpes do gênero *Mycoplasma* através de critérios fenotípicos é de difícil execução e reprodução em laboratórios de rotina devido às constantes variações antigênicas de algumas espécies do gênero Mycoplasma e reações cruzadas entre as espécies (POVEDA, 2010).

O uso de testes bioquímicos, sorológicos e genômicos isolados, nem sempre permitem a identificação de isolados de micoplasma e definição de uma nova espécie (WHITCORNB *et al*., 1995; BROWN *et al*., 2007).

VOLOKHOV *et al*. (2006) observaram que a análise isolada das sequências das regiões do gene 16S e 23S não foi suficiente na diferenciação das espécies de micoplasmas. É provável que isso se deva ao fato do elevado percentual de similaridade (97,9 a 99,8%) das sequências de nucleotídeos desta região, quando comparada entre espécies diferentes de micoplasmas de um mesmo grupo filogenético.

A análise da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (IGRS) demonstra um menor percentual de similaridade das sequências de nucleotídeos (76,8 a 88,7%) entre diferentes espécies de micoplasmas. A região IGRS apresenta poucos sítios de polimorfismo nas sequências de nucleotídeos entre estirpes de micoplasma de uma mesma espécie, o que se traduz em pequena variação dessa região dentro de uma mesma espécie de micoplasma, e assim torna a análise da região uma ferramenta na epidemiologia molecular e de tipagem genotípica das espécies de micoplasma de importância econômica para avicultura (CHALKER e BROWNLIE, 2004; VOLOKHOV *et al*., 2006; RAMIREZ *et al*., 2008).

Em 2007, o membro do Subcomitê de Taxomomia de Molicutes discutiu as vantagens da análise da região IGRS, frente a outros marcadores moleculares de diferenciação de espécies e sub espécies de micoplasmas (VOLOKHOV *et al*., 2006).

Vários autores apontaram a região IGRS como um dos marcadores genéticos mais promissores no estudo da diversidade populacional e epidemiologia molecular dos micoplasmas cultiváveis, fastidiosos, não cultiváveis, de identificação ambígua e de espécies ainda não descritas (BANO *et al*., 2007; MAYOR *et al*, 2008; FIRRAO e BROWN, 2011; VOLOKHOV *et al*., 2011; VRANCKX *et al*., 2011).

Pela análise da região IGRS, RAVIV *et al*. (2007) encontraram uma taxa de variação entre 94,6 a 100% entre as estirpes de *Micoplasma gallisepticum* e permitiu a diferenciação ou agrupamento das estirpes deste micoplasma. E ainda relataram o potencial da PCR-IGRS na possibilidade de uma diferenciação rápida e eficiente entre as estirpes de MG vacinais das estirpes selvagens de campo.

Neste trabalho foi avaliada a a dinâmica do cultivo bacteriano e a tipagem genotípica das estirpes de micoplasmas de poedeiras, reprodutores e frangos de corte disponibilizadas no Setor de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, com o objetivo de estabelecer a filogenia evolutiva dos micoplasmas da avicultura industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas 122 amostras de traqueias no total, sendo 71 de poedeiras do estado de Minas Gerais, 18 traqueias de reprodutores do estado de Minas Gerais e 12 traqueias de poedeiras do estado do Espírito Santo e 21 traqueias de frango de corte do estado de Minas Gerais (n= 122).

Os suabes individuais das traqueias de aves vivas foram coletados, organizadas em grupos de poedeiras (P), reprodutores (R), e frangos de corte (FC) no Setor de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG.

Os suabes foram resuspendidos em 1,5 mL de caldo de Frey, segundo TULLY (1995a). O caldo foi filtrado através de membrana Millipore® de

0,45 µm de poro (TULLY,1995b) e a ausência de micro-organismos aeróbios foi confirmada em placa de sangue desfibrinado, incubadas por 24h a 37 ^{o}C. Como controle positivo do crescimento bacteriano foram utilizadas estirpes comerciais de vacinas vivas de MG (*MGF-Vax* e MG70-*MycoGalli*), respectivamente uma estirpe americana e brasileira, das empresas *Schering Plough*® (Kenilworth, New Jersey) e *Biovet*® (Vargem Grande Paulista, São Paulo).

O isolamento e purificação do DNA genômico e controles positivos das PCRs (*MGF-Vax*, e MG70-*MycoGalli*, MGBAC-*R890*), antígenos coloridos para SAR (MG e MS) e suabes diretos das mucosas das traqueias foram realizadas pelo método de fenol-cloroformio-alcool-isoamilico (25:24:1), segundo SAMBROOK *et al*. (2001) e BASHIRUDDIN (2010).

As amostras pré-enriquecidas foram extraídas pelo método de fervura-congelamento rápidos padronizado pela OIE (MANUAL, 2004) e modificado por BASHIRUDDIN (2010).Uma alíquota de 1,0 µL de cada amostra de DNA, diluído na concentração de 200 ng/µl, foi utilizada como molde na reação de amplificação em um volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador *Axygen-Maxygene*®.

A visualização dos resultados das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose e os resultados foram revelados com o auxílio de um transiluminador UV.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel* and PCR *Clean – UP System*® (*Promega*), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (*NanoDrop* 1000®).

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al*. (1977). Para a realização das reações de sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático capilar Mega Base 1000 (HEALTHCARE®), do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária (UFMG).
A reação de sequenciamento foi feita em placa de 96 poços, em termociclador (*Eppendorf* 96-well Mastercycler®), utilizando uma alíquota de 100 ng do produto de PCR purificado. Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti senso, foi utilizado o programa Phred (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/ ph ph/). O sequenciamento de todas as repetições de cada amostra foi utilizado para a montagem e visualização das sequências consenso final com a utilização da ferramenta CAP3 do Phred (EWING e GREEN, 1998).

Conforme previamente descrito por ALTSCHUL *et al*. (1997), todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram feitos com o auxílio do programa Clustal W versão 1.6 implementado no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis® (MEGA 5.0/ www.megasoftware.net), sendo que todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente usando versão 7.0 do Bioedit ® (HALL, 1999). Os alinhamentos de nucleotídeos dos produtos analisados neste trabalho foram utilizados para a construção de árvores filogenéticas com o auxílio do programa MEGA® 5.0 (www.megasoftware.net).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das sequências analisadas de micoplasmas de 41 produtos de PCR-IGRS de poedeiras, nove de reprodutores, quatro de frango de corte, três de vacinas comerciais e três de antígenos comerciais, foram demonstradas a alta qualidade dos eletroferogramas das 54 amostras positivas para micoplasma pela IGRS-PCR.

Para a extração do DNA de micoplasmas do caldo de pré-enriquecimento previamente purificado, a preparação da amostra pelo método de fervura e congelamento rápidos com lavagens em PBS demonstrou ser prática e rápida para amostras pré-enriquecidas.

Como os micoplasmas são desprovidos de parede celular, eles são fácilemente lisados pelos métodos físicos-químicos. Segundo JOHANSSON *et al*. (2010), utilizando a técnica

de extração direta e a técnica de PCR-RFLP, na maioria dos casos foi possível utilizar o DNA molde do micoplasmas a partir da solução de lise nas reações de digestão enzimática.

A obtenção do DNA genômico sem qualquer etapa de purificação foi satisfatória, quando comparada ao fenol-clorofórmio-álcool-isoamilico (FCA), e gerou resultados satisfatórios para a PCR-IGRS (Fig.1), sendo estes semelhantes aos obtidos por LAUERMAN *et al*. (1995) e JOHANSSON *et al* (2010).

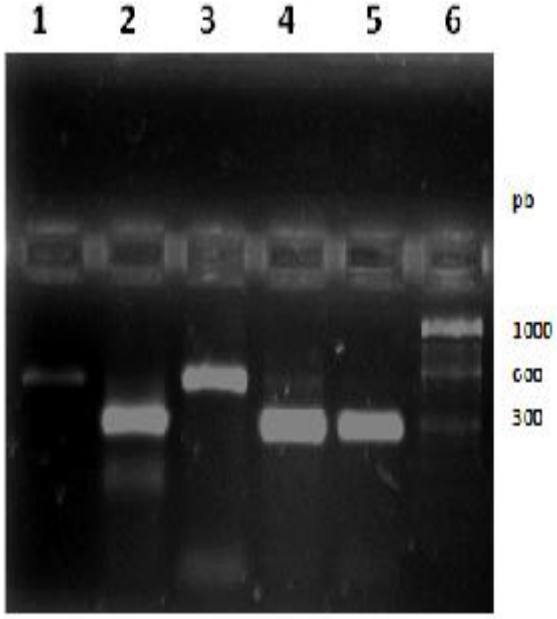


Figura 1. Eletroforese dos produtos da PCR IGRS para diferenciação de bactérias do gênero *Mycoplasma*: canaleta 1=amostra de campo BRA/MG562P0511 de MG (645 pb); canaleta 2=amostra de campo BRA/MG770R0512 de MIN (308 pb); canaleta 3=amostra vacinal MGF; canaletas 4 e 5=amostras de campo BRA/ES635P1011 e BRA/ES687P1011 de MGN (305 pb); canaleta 6=marcador de tamanho molecular.

O método de fervura foi testado em nosso laboratório, tendo sido comparado a outros métodos de extração de DNA, tais como sílica (BOOM *et al*., 1991) e do fenol clorofórmio (SAMBROOK *et al*., 2001) e demonstrou superioridade quanto à rapidez, simplicidade, custo, segurança e sensibilidade (BUZINHANI, 2001).

O DNA da estirpe BRA/MG564P0511 somente foi extraído pelo método FCA, diretamente do suabe da traqueia. Apesar da estirpe BRA/MG564P0511 ter sido isolada de um mesmo grupo de poedeiras das estirpes BRA/MG562P0511 e BRA/MG563P0511 e todas as três terem sido positivas para MG na reação da PCR-IGRS nos suabes de traqueia, não houve indicativo de crescimento e reação positiva da PCR-IGRS no caldo de pré-enriquecimento para a estirpe BRA/MG564P0511.

Estudos realizados por ZAIN e BRADBURY (1996) demostraram as vantagens do pré-enriquecimento prévio em caldo de Frey pelo aumento da taxa de recuperação e sobrevivência de um pequeno número de micoplasmas dos suabes, além das possibilidades de manutenção e purificação dos micro-organismos.

Porém, é preciso salientar o papel do uso dos antimicrobianos da classe da tilosina (tiamulin), enrofloxacina, respectivamente macrolídeos e quinolonas, no comprometimento do diagnóstico etiológico dos micoplasmas. Segundo KLEVEN (2008), a não suspensão destes antibióticos, antes do procedimento de coleta dos espécimes clínicos, predisporiam o agente a escapar para os tecidos do hospedeiro. Assim, tornaria mais difícil sua detecção pelos métodos bacteriológicos de rotina e PCR.

No momento da coleta do material para o diagnóstico, ao grupo de poedeiras em questão estava sendo administrado tialumin associado à enrofloxacina na ração. Esse fato poderia explicar que o sequenciamento direto da PCR, a partir da solução de lise das amostras BRA/MG562P0511, BRA/MG563P0511 e BRA/MG564P0511, apresentou uma variação nos resultados de amostras de um mesmo grupo de poedeiras.

Para a construção da árvore filogenética, foram escolhidas sequências depositadas no GenBank de diferentes estirpes de micoplasmas na tentativa de estabelecer uma classificação e evolução molecular com base em critérios filogenéticos.

Observa-se na Figura 2, o *cluster* filogenético de *Mycoplasma pneumoniae* (vermelho) e sua relação de ancestralidade com *M. muris* (roxo), *M. synoviae* (azul) e *M. bovis* (verde),

demonstrando a especificidade dos alinhamentos das sequências de nucleotídeos. Observa-se a estirpe *E. coli* (LW1655F) que foi utilizado como *outgroup* (amarelo).

Os resultados obtidos na análise da sequência da região IGRS organizaram as estirpes de micoplasmas em dois grandes grupos filogenéticos – Pneumoniae e Hominis – e quatro *clusters* filogenéticos, como descrito por e RAMIREZ *et al*. (2008) e JOHANSSON *et al*. (2010), e possibilitaram a filogenética molecular e evolutiva entre as sequências de nucleotídeos obtidas e acessadas no GenBank para as estirpes do gênero *Mycoplasma*.

Na Figura 2, verifica-se, como descrito por RAMIREZ *et al*. (2008), os *clusters* filogenéticos *Mycoplasma pneumoniae*, *M. muris*, *M. synoviae* e *M. bovis* pelo alinhamento das sequências de nucleotídeos da região IGRS dos micoplasmas aviários.

Na Tabela 5 foram sumarizados os dados das dez sequências de nucleotídeos de MG da avicultura industrial, três de vacinas comerciais, duas estirpes de antígenos coloridos e de oito sequências de nucleotídeos da região IGRS de diferentes partes do mundo. As 23 estirpes de MG, pertencentes ao *cluster* filogenético *Mycoplasma pneumoniae*, somadas a estirpe de referência de *M. iowae (*695), pertencente ao *cluster* filogenético *M. muris*, formam o grupo filogenético Pneumonia (Fig. 1)

A Tabela 6 apresenta dados das 44 estirpes de *M. gallinarum* (MGN), *M. iners* (MIN), *M. gallinaceum* (MGC), *M. pullorum* (MP), *M. glycophilum* (MGL) e *M. meleagridis* (MM) da avicultura industrial, uma amostra de antígeno colorido de MS e nove sequências de nucleotídeos acessadas do GenBank. Neste estudo foram obtidas 18 estirpes de MGN, 12 de MIN, 11 de MP, sete de MGC, três de MGL, duas de MS e uma de MM (n=54). A análise das relações evolutivas e filogenéticas da árvore (Fig. 1) demonstrou que as 54 estirpes de micoplasmas foram distribuídas no grupo filogenético Hominis, conforme a descrição de RAMIREZ, *et al*. (2008); JOHANSSON *et al*. (2010).

Das 54 amostras testadas, dez apresentaram análise de sequência de nucleotídeos com elevada similaridade para estirpes vacinais de *M. gallisepticum* (MGF, MGR e MG70) e demonstraram uma frequência relativa de 18,5% na avicultura industrial (Fig. 3).

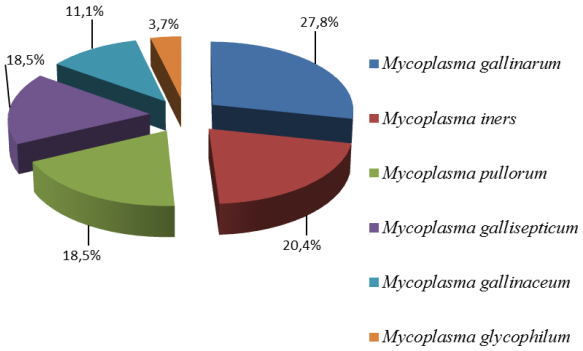


Figura 3. Distribuição das espécies de micoplasmas genotipados obtidas de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) da avicultura industrial de Minas Gerais e do Espírito Santo no período de maio/2011 a outubro/2012.

No grupo de poedeiras (BRA/MG562P0511, BRA/MG563P0511 e BRA/MG564P0511) e dos frangos de corte (BRA/MG780FC1012,BRA/MG786FC1012 e BRA/MG788FC1012) positivos para a análise das sequências de nucleotídeos, observou-se doença clínica respiratória e reação positiva para SAR em placa para MG. As quatro estirpes positivas listadas dos reprodutores (BRA/MG493R0511, BRA/MG494R0511, BRA/MG628R0911 e BRA/MG629R0911) constituem achados importantes no experimento, pois estas aves estavam sob suspeita de terem sido vacinadas e apresentavam sinais de DRC. Essa informação pode significar a presença da circulação de diferentes estirpes vacinais de MG dentro dos sistemas de criação da avicultura de produção.

A análise da atividade metabólica da glicose, revelou que nove estirpes de MG pré-enriquecidas em caldo de Frey a 37^{o}C durante 144 horas apresentaram uma dinâmica de cultivo variável (Tab. 7). Neste estudo, as estirpes foram classificadas em três grupos: aquelas que se

adaptaram rapidamente à glicose do meio foram agrupadas filogeneticamente junto com a vacina da estripe MG70 (G1); um grupo de estirpes se adaptaram de maneira mais lenta à glicose do meio, de crescimento mais lento e apresentaram um comportamento semelhante ao da estirpe vacinal de MGF (G2) e uma estirpeBRA/MG564P0511 não cultivável no caldo de Frey (G3).

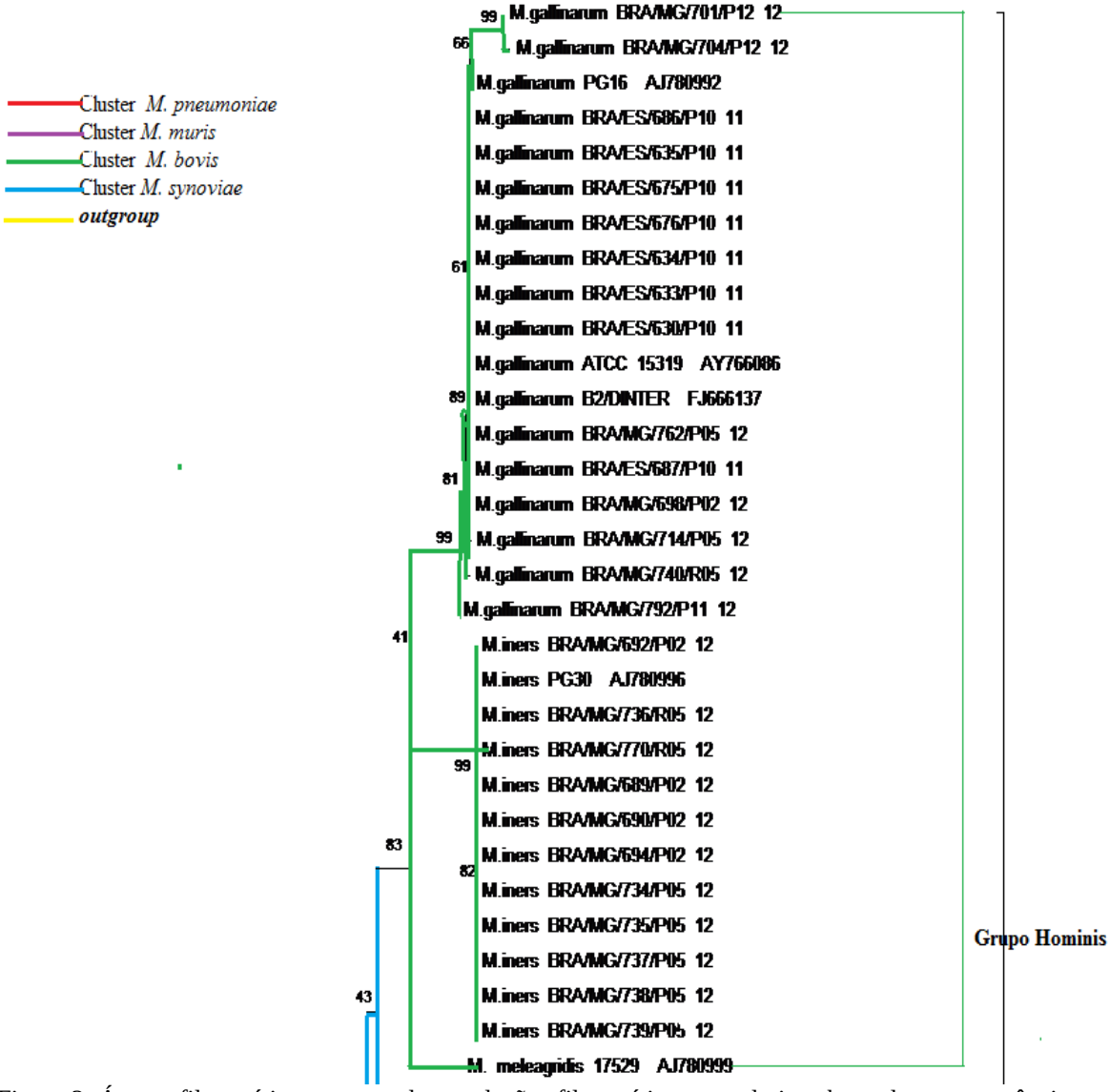


Figura 2. Árvore filogenética monstrando as relações filogenéticas e evolutivas baseadas nas sequências de nucleotídeos da região IGRS entre as 54 estirpes do gênero *Mycoplasma* obtidas no estudo, entre maio/2011 a outubro/2012. A árvore foi construída pelo método de evolução mínima (MEGA 5.0) com teste de confiança da topologia dos ramos com reamostragem de 1000 replicações. Número de acesso ao GenBank foram citados para cada sequência de referência.

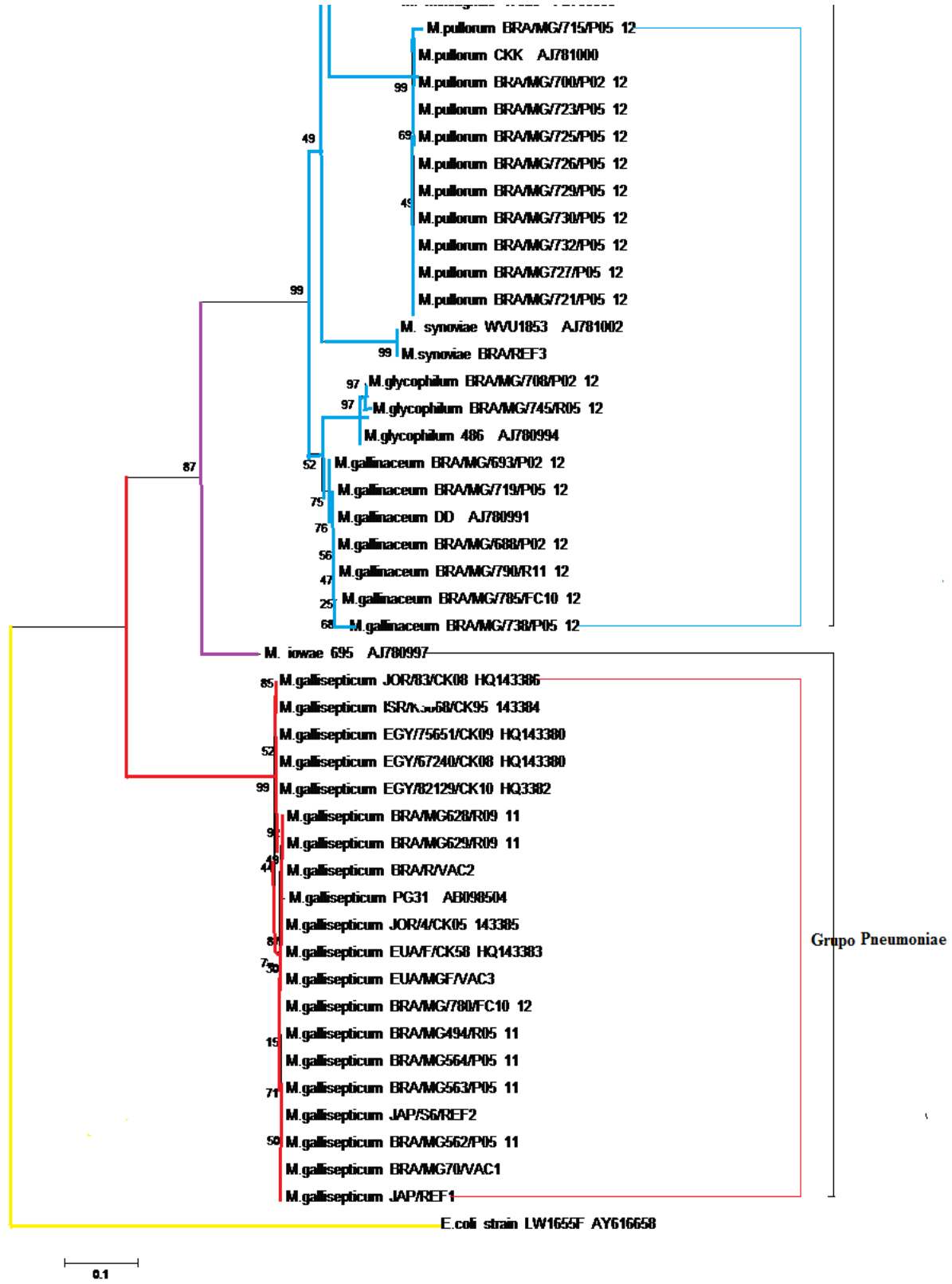


Figura 2. (continuação)

Tabela 5. Sequências de nucleotídeos de *Mycoplasma gallisepticum* e estirpes de referência usadas na geração da árvore no período de maio/2011 a outubro/2012 (grupo filogenético Pneumoniae).

Nome	Origem/ noGenBank	Espécie	Cluster filogenético
BRA/MG493R0511	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG494R0511	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG562P0511	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG563P0511	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG564P0511	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG/628R0911	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA//MG/629R0911	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG780/FC1012	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG786/FC1012	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG/788/FC1012	Minas Gerais	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
BRA/MG70/VAC1	São Paulo	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EUA/MGR/VAC2	Iowa	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EUA/MGF/VAC3	New Jersey	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
JAP/REF1	Japão	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
JAP/S6/REF2	Japão	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
JOR/4/CK05	Jordânia	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
JOR/83/CK08	Jordânia	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EGY/67240/CK08	Egito	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EGY/75651/CK09	Egito	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EGY/82129/CK10	Egito	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
ISR/K3868/CK95	Israel	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
EUA/F/CK58	Califórnia	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
PG31	AB098504	*M. gallisepticum*	*M. pneumoniae*
695	AJ780997	*M. iowae*	*M. muris*

BRA/MG564P0511) não cultivável no caldo de Frey (G3).

As diferenças na utilização da glicose e viragem do pH nos G1 e G2 podem estar relacionadas à adaptação das estirpes *in vitro*. Segundo YODER JR (1986), citado por KLEVEN (1998), estirpes de crescimento rápido, consideradas de baixa patogenicidade, causariam infecções crônicas por MG. Por um outro viés, GHARAIBEH *et al*. (2011) levantaram a possibilidade das estirpes mais fastidiosas serem justamente aquelas de maior patogenicidade.

Apesar da dinâmica de crescimento estar de acordo com a tipagem genotípica das estirpes vacinais MGF e MG70 pela análise dos nucleotídeos depositados nos bancos de sequências de micoplasmas, a comparação entre a análise da tipagem genotípica e a dinâmica de crescimento não confirmam ou negam a hipótese que os grupos possam estar infectados com mais de uma estirpe de MG ao mesmo tempo. Segundo GHARAIBEH *et al*. (2011) isso seria factível, desde que a presença de estirpes MG mais adaptadas a cultura *in vitro* competissem com o crescimento de estirpes fastidiosas e de maior patogenicidade.

As estirpes de *M. gallinarum* representaram 27,8% do estudo demonstraram uma variação em relação à observação da doença respiratória. O grupo de oito poedeiras recebidas do Espírito Santo apresentou sinais clínicos e anatomopatológicos compatíveis à de coriza infecciosa das galinhas, caracterizados por: estertores, descarga nasal contínua, inchaço dos seios infra orbitais, tampão caseoso nas vias nasais e aerosaculite. Entretanto, outras sete, das 15 estirpes de MGN, foram obtidas de poedeiras e reprodutores hígidos de Minas Gerais (Tab. 5).

Com relação à atividade metabólica da glicose e arginina, as amostras típicas de MGN fermen

Tabela 6. Sequências de nucleotídeos de *M. gallinarum, M. iners, M. gallinaceum*, *M. pullorum*, *M. glycophilum* e estirpes de referência usadas na geração da árvore filogenética no período de maio/2011 a outubro/2012 (grupo filogenético Hominis).

Nome	Origem /noGenBank	Espécie	Cluster filogenético
BRA/ES630P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES633/P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES634P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES635P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES675P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES676P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES686P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/ES687P1011	Espírito Santo	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG698P0212	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG701/P1212	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG704/P1212	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG714P0512	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG740R0512	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG762/P0512	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
BRA/MG792P1112	Minas Gerais	*M. gallinarum*	*M. bovis*
PG16	AJ780992	*M. gallinarum*	*M. bovis*
ATCC15319	AY766086	*M. gallinarum*	*M. bovis*
B2 DINTER	FJ666137	*M. gallinarum*	*M. bovis*
17529	AJ780999	*M. meleagridis*	*M. bovis*
BRA/MG689P0212	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG690P0212	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG692P0212	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG694P0212	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG734P0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG735P0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG736R0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG737P0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG738P0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG739P0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG770R0512	Minas Gerais	*M. iners*	*M. bovis*
PG30	AJ780996	*M. iners*	*M. bovis*
BRA/MG700P0212	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG715P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG721P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG723P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG725P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG726P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG727P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG729P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG730P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG732P0512	Minas Gerais	*M. pullorum*	*M. synoviae*
CKK	AJ781000	*M. pullorum*	*M. synoviae*
BRA/MG708P0212	Minas Gerais	*M. glycophilum*	*M. synoviae*
BRA/MG745R0512	Minas Gerais	*M. glycophilum*	*M. synoviae*
486	AJ780994	*M. glycophilum*	*M. synoviae*
BRA/MG688P0212	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/MG693P0212	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/MG719P0512	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/MG738P0512	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/MG785FC1012	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/MG790R1112	Minas Gerais	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
DD	AJ780991	*M. gallinaceum*	*M. synoviae*
BRA/REF3	Minas Gerais	*M. synoviae*	*M. synoviae*
WVU1853	AJ781002	*M. synoviae*	*M. synoviae*

tam melhor a arginina (BRADBURY, 2010). A dinâmica de crescimento das 15 amostras frente à glicose demonstrou que sete amostras se adaptaram à fermentação da glicose do meio com variação de 2+ a 3+ (Tab. 5). O fato destas amostras não estarem puras no teste de aerobiose em ágar sangue, nesta fase de pré-enriquecimento, explicou a diferença na dinâmica de crescimento observada. Para confirmar tal fato, foi realizada a purificação, pela filtração em membrana Milipore® 0,45 µm e repique das 15 estirpes MGN em repique no caldo de Frey a 37°C, substituindo-se a L-cisteína por arginina na composição, durante 144 horas.

Um dos achados importantes neste estudo foi a elevada ocorrência de MGN em poedeiras, principalmente associadas à coriza infecciosa das galinhas, porém apresentando uma frequência menor em poedeiras hígidas do que aquelas que apresentavam sinais respiratórios. PEREIRA *et al*. (2011) relataram um caso clínico de doença respiratória por MGN em poedeiras comerciais, em que lesões macroscópicas de doença respiratória foram descritas nas aves e não foram encontrados outros agentes respiratórios.

Conforme os dados apresentados na Tabela 7, a análise da dinâmica do crescimento de micoplasmas para as demais estirpes do grupo Hominis demonstrou certa seletividade com relação à rápida adaptação à fermentação da glicose do meio (3+ e 4+), como esperados para as espécies de MGL, MGC e MP. Para as estirpes de MIN não se observou adaptação rápida à fermentação da glicose (1+), como relatado por TAYLOR (1996).

Com relação à frequência encontrada para os demais micoplasmas comensais do grupo filogenético Hominis observou-se que, para as amostras coletadas em Minas Gerais, todas as aves estavam hígidas. Dentre as espécies de micoplasmas descritos como não patogênicos para galinhas, não foi encontrada a espécie *Mycoplasma lipofaciens*, pertencente a este grupo filogenético (Fig.1), sendo esta espécie relatada simultaneamente em galinhas e perus, por BRADBURY (2010).

O resultado sugeriu que a genotipagem pela PCR-IGRS permite a diferenciação satisfatória de seis das nove espécies de micoplasmas previamente descritas em galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Os micoplasmas de outros hospedeiros aviários, a exemplo do urubu, pombo, abutre e falcão, que são considerados estreitamente relacionados e podem estar circunvizinhas às granjas, não foram detectados em galinhas.

O fato de não ter sido encontrada outra espécie de micoplasma nas galinhas da avicultura industrial deste estudo, a qual tenha sido previamente descrita em outras espécies de aves, parece não excluir a possibilidade de micoplasmas descritos em galinhas serem detectados em outras espécies de aves susceptíveis. Estirpes de MG foram descritos em Pscitácideos de cativeiros, demonstrando que possivelmente estas aves possam ter tido contato direto ou indireto com os micoplasmas descritos em galinhas (GOMES *et a*l., 2010).

Tabela 7. Atividade metabólica da glicose para as estirpes de micoplasmas pré -enriquecidas em caldo de Frey a 37°C durante 144 horas.

Viragem de pH/Grupo	Nome
vermelho (1+)	630(MGN), 633(MGN), 634(MGN), 635(MGN), 675(MGN), 676(MGN), 686(MGN), 687(MGN), 734(MIN), 735(MIN), 736(MIN), 737(MIN), 738(MIN), 739(MIN), 770(MIN)
alaranjado (2+) - G2	MGF(C+), 628(MG), 629(MG), 780(MG), 786(MG), 788(MG) 701(MGN), 714(MGN), 740(MGN), 762(MGN), 792(MGN), 694(MIN)
amarelo (3+)	698(MGN), 704(MGN), 689 (MIN), 690(MIN), 692(MIN), 715(MP), 721(MP), 723(MP), 725(MP), 726(MP), 727(MP), 729(MP), 730(MP), 732(MP), 688(MGC), 719(MGC), 790(MGC)
amarelo ouro (4+) - G1	MG70(C+), 562(MG), 563(MG), 493(MG), 494(MG), 700(MP), 708(MGL), 745(MGL), 693(MGC), 738(MGC), 785(MGC)

Mycoplasma gallisepticum (MG), *M. gallinarum* (MGN), *M. iners* (MIN), *M. gallinaceum* (MGC), *M. pullorum* (MP), *M. glycophilum* (MGL). 564 (MG) – estirpe não cultivável pertencente ao G3.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER, A. A. *et al*. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BROWN, D.R.; WHITCOMB, R.F.; BRADBURY, J.M. *et al*. Revised minimal standards for descripition of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). I*nternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 11, p. 2703-2719, 2007.

BANO, N.; BENNETT, W.; VASQUEZ, L. *et al*. Dominance of Mycoplasma in the guts of the Long-Jawed Mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes. *Environmental Microbiology*, v.9, n. 10, p. 2636–2641, 2007.

BASHIRUDDIN, J.B. Extraction of DNA from Mycoplasma. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds.) *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 141-144.

BOOM, R; SOL, C.J.; SALIMASNS, M. *et al.*Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 495-503, 1990.

BRADBURY, J.M. Recovery of Mycoplasmas from birds. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds.) *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 45-51.

BROWN, D.R.; WHITCOMB, R.F.; BRADBURY, J. M. *et al*. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). International *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 11, p. 2703-2719, 2007.

BUZINHANI, M. Detecção de micoplasmas no trato reprodutivo de fêmeas bovinas com distúrbios reprodutivos por cultivo e reação em cadeia da polimerase. 2001. 63f. Dissertação

(Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP.

CHALKER, V.J.; BROWNLIE, J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 537–542, 2004

EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FIRRAO, G.; BROWN, D.R. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. Minutes of the meetings. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 695–697, p. 2011

GHARAIBEH, S.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R. *et al*. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan. *Avian Diseases*, v. 55, n. 2, p. 212-216, 2011.

GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R. *et al.* Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 12, n. 2, p. 75-78, 2010.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequencer alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, n. 5, p. 95-98, 1999.

JOHANSSON, K-E.; HELDTANDER, M.U.K.; PETTERSSON, B. Caracterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primes. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds). *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v, 104, p. 145-165.

KLEVEN, S. H. Mycoplasmosis. In: SWAYNE, J.R.; GLISSON, M.W.; JACKWOOD, J.E. *et al*. (Eds.) *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Kennet Saquare, PA: American Association of Avian Pathologists, 4 ed., 1998, p. 74-80.

KLEVEN, S.H. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Diseases*. v. 52, n. 3, p. 367-374, 2008.

LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A. *et al*. Avian Mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, v. 39. n. 4, p. 804-811, 1995.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. In: Avian mycoplasmosis - *Mycoplasma gallisepticum* (2004). Paris: OIE Biological Standards Commission. 5 Ed. v. 2, cap. 2.7.3, p. 842-855.

MAYOR, D.; JORES, J.; KORCZAK, B. *et al*.. Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Veterinary Microbiology*, v. 127, n. 2, p. 63–72, 2008.

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

POVEDA, J.B. Biochemical characteristics in Mycoplasma identification. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds). *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 69-78.

RAMIREZ, A.S.; NAYLOR, C.J.; PITCHER, D.G. *et al*. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n. 4 p.279–287, 2008.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N. *et al*. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region

sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases*, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning* a laboratory manual. In: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2, cap 8, p. 818-896.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p.5463-5467, 1977.

TAYLOR, R.R.; MOHAN, K.; MILES, R.J. Diversity of energy-yielding substrates and metabolism in avian micoplasmas. *Veterinary Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 291-304, 1996.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of molicutes in molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. In: RAZIN, S; TULLY, J. G., (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995a, v. 1, p. 33-39.

TULLY, J.G. Cloning and filtration tecnhiques for mycoplasmas: mycoplasma. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995b, v. 1. p. 173-177.

VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X. *et al*. Sequencing of the intergenic 16S–23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Appield Microbiology and Biotechnology*, v. 71, n. 5, p. 680–698, 2006.

VOLOKHOV, D.V.; NORRIS, T.; RIOS, C. *et al*. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Microbiology*, v.149, n.1, p.262–268, 2011.

VRANCKX, K.; MAES, D.; CALUS, D. *et al*. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis is a suitable tool forthe differentiation of *M. Hyopneumoniae* strains without cultivation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 5, p. 2020–2023, 2011.

WHITCORNB, R.F., TULLY, J.G., BOVE, J.M. *et al*. Revised minimum standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*). *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 605–612, 1995.

YODER JR, H.W. A historical account of the diagnosis and characterization of strais of *Mycoplasmas gallisepticum* of low virulence. *Avian Diseases*. v. 30, n. 3, p. 510-518, 1986.

ZAIN, Z.M.; BRADBURY, J.M. Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum c*ollected on applicator swabs. *Veterinary Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 45-57, 1996.

CAPÍTULO II

ESTUDO FILOGENÉTICO E DE LETALIDADE EMBRIONÁRIA DE *MYCOPLASMA GALLINARUM* ISOLADOS DE GALINHAS DA AVICULTURA INDUSTRIAL DE POSTURA

[Filogenetic *and chicken embryo lethal studies of Mycoplasma gallinarum strains iolates from poultry industry – Brazil*]

RESUMO

Foram realizadas reações PCR da região transcrita do espaço intergênico entre 16S e 23S do RNA ribossomal (16S-23S IGRS), análise das sequências de nucleotídeos e infeções embrionárias de *Mycoplasma gallinarum* (MGN) isolados da avicultura industrial dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Investigou-se um lote de galinhas poedeiras do Estado do Espírito Santo (n=12) que apresentavam sinais clínicos e anatomopatológicos semelhantes à coriza infecciosa das galinhas, como estertores, descargas nasal contínua, inchaço dos seios infra orbitais, tampão caseoso nas vias nasais e aerosaculite. As sete sequências de nucleotídeos do grupo do Estado de Minas Gerais foram obtidas dos três lotes de poedeiras e um lote de reprodutor que não apresentavam sinais de doença respiratória. Foram realizadas PCRs específicas para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS), sendo os resultados negativos para amplificação do genoma de MG e MS. As 15 amostras foram repicadas em caldo de Frey (0.3% de glicose; 0.1% de arginina e 12% de soro equino) em microaerofilia a 37^{o}C, até a viragem do vermelho de fenol a cada 24 horas. Foram inoculados 1 x 10^{6} UFC-MGN/0,1mL, em grupos de oito ovos embrionados livres de patógenos específicos. O grupo MGN do Espírito Santo demonstrou mortalidade de 18,5% de ovos inoculados até 48 h pós-inoculação. Este grupo apresentou taxa de letalidade de 7/15 (46,7%) entre o 3^{o} e 4^{o} dia pós-inoculação. Os resultados podem sugerir perdas consideráveis no sistema de produção de ovos férteis. A tipagem genotípica da região IGRS possibilitou a classificação das estirpes em dois grupos, sem relação geográfica com uma estirpe MGN ATCC 15319 (Cambridge, Inglaterra) e B2/Dinter (Estados Unidos) utilizadas como padrões de comparação na construção da árvore filogenética. A análise das relações filogenéticas entre as estirpes brasileiras demonstrou discreta distância filogenética entre as estirpes MGN do estado de Minas Gerais. Apesar das estirpes MGN da avicultura de Minas Gerais apresentarem relação geográfica com as estirpes de MGN do Espírito Santo, este último grupo foi mais homogêneo e não apresentou distância filogenética notável entre si.

ABSTRACT

The 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences (IGRS) of *Mycoplasma gallinarum* (MGN) strains isolates from poultry industry in the states of Minas Gerais and Espirito Santo (Brazil) were amplified by PCR, and nucleotide sequences analysis of the PCR products and chicken embryo inoculation were performed. Layer hens of Espírito Santo (n=12) had clinical signs and anatomo-pathological alterations, however these were similar to infectious coryza, continuous nasal discharges, swollen infra orbital sinuses, exsudate blockage of nasal passages and airsacculitis. The seven nucleotide sequences were obtained from three flocks of normal layer chickens and broiler breeders of the poultry industry of Minas Gerais. The specific PCRs were performed for the investigation of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) and were negative. The Fifteen samples were grown in Frey's broth (0,3% glucose, 0,1% arginine and 12% horse serum) at 37 °C in microaerophilic conditions until

acidification showed by phenol red changed to yellow in 24/24 hours. Chicken embryo inoculation was performed with 1 x 10^6 UFC-MGN/0,1mL given yolk sac route in *specific pathogen free* (SPF) embryonated eggs. The Espírito Santo MGN cluster strains caused an embryonic death of 18.5% and were lethal to 7/15 (46,7%) at the 3rd and 4th days post-inoculation. Results suggested that MGN isolates may represent a threat to full productivity in the poultry industry. Aligned sequences of local MGN strains did not group with the prototype strains ATCC 15319 (UK) and B2/Dinter (USA). The Minas Gerais strains showed high phylogenetic similarity with the Espírito Santo strains, although the Minas Gerais strains were more dissimilar and more genetically distant as compared to the Espírito Santo strains. The Minas Gerais MGN strains showed high phylogenetic similarity with Espírito Santo strains, although the cluster of MGN of Minas Gerais presented more phylogenetic distances with the cluster than the MGN strains of Espírito Santo.

1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas são importantes causas de doenças respiratórias e da queda de produção em poedeiras de regiões produtivas intensificadas, particularmente aquelas submetidas aos desafios sanitários e estresse do ambiente (JORDAN, 1996).

Apesar da importância econômica de algumas espécies de micoplasmas aviários não estar totalmente bem estabelecida, é possível que, em certas circunstâncias, espécies comensais do gênero *Mycoplasma* possam tornar-se patogênicos às aves (BRADBURY, 2010).

KLEVEN *et al*. (1978), citado por SHAH-MAJID (1996), descreveram uma forma de doença respiratória e aerossaculite severa causada por *Mycoplasma gallinarum* (MGN) em frangos de corte associada sinergicamente a vírus, como estirpes vacinais e autóctones da doença de Newcastle, da bronquite infecciosa das galinhas, principalmente os sorotipos Massachusetts M41, H-52 e H-120. Os resultados demonstraram que a aerossaculite desenvolvida pelos frangos comprometeu o seu desempenho.

Em levantamento epidemiológico de bactérias do gênero *Mycoplasma* em diferentes espécies de aves do sul da Espanha, POVEDA *et al*. (1990) verificaram ser o MGN o micoplasma de maior ocorrência entre as aves.

Apesar dos relatos de isolamento de MGN em sacos aéreos e traqueias de frangos de corte que foram condenados por aerossaculite (KLEVEN, 2008) e do seu frequente isolamento na microbiota do trato respiratório das aves (JORDAN, 1979), a importância do agente para a avicultura brasileira se deu a partir do relato de um caso em poedeiras, no estado do Rio de Janeiro (PEREIRA *et al*., 2011).

Em 2011 houve um surto de doença respiratória em poedeiras comerciais no RJ. As aves estavam negativas para MG e o único agente isolado foi MGN. As manifestações clínicas e os achados anatomopatológicos - conjuntivite, traqueíte, aerossaculite, peri-hepatite e peritonite - poderiam estar diretamente relacionadas ao MGN, segundo descrição do relato de caso por PEREIRA *et al*. (2011).

Relatos de isolamento de MGN em embriões de galinha (SHAD-MAJID, 1994), oriundos de trato respiratório de frangos de corte (KLEVEN *et al*., 1978) e de galinhas caipiras (SHAH-MAJID, 1996) foram previaente publicados foram e são concordantes com resultados deste trabalho.

Em infecção experimental, SILVA (2013) testou a positividade da PCR em traqueias de grupo de frangos de corte infectados com estirpe autóctone de MGN associado ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VIBIG) do sorotipo Massachusetts H-120 vacinal e em outro grupo apenas inoculado com estirpe autóctone de MGN, comprovou que a vacinação com VBIG em um dos grupos pode ter influenciado na infectividade da estirpe de MGN autóctone e resultou em maior taxa de detecção neste grupo.

No presente trabalho foram avaliadas as relações da epidemiologia molecular e a patogenicidade em ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free* - livres de patógenos específicos) das diferentes estirpes de MGN da avicultura de postura dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo disponibilizadas na rotina de diagnóstico do Setor de Doenças das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 8. Iniciadores específicos para detecção de MG e MS utilizados na PCR

Iniciador	Sequência	Referência	Produto (pb)
MG-14F	5´ GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3´	OIE (MANUAL,2004)	185
MG-13R	5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC3'		
MS-F	5'GAGAAGCAAAATAGTGATATCA3'	LAUERMAN et al., 1993;	207
MS-R	5'CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA3'	OIE (MANUAL, 2008)	

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas traqueias obtidas de cinco lotes distintos: três lotes de poedeiras do Estado de Minas Gerais (71 amostras), um lote de poedeiras do Estado do Espírito Santo (12 amostras) e um lote de reprodutores do Estado de Minas Gerais (18 amostras).

Os suabes foram inoculados em 1,5 mL de caldo de Frey, segundo TULLY (1995a). O caldo foi filtrado através de membrana Millipore® de 0,45 µm de poro (TULLY, 1995b). As amostras pré-enriquecidas foram extraídas pelo método de fervura-congelamento rápidos padronizado pela OIE (MANUAL, 2004) e modificado por BASHIRUDDIN (2010). O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma do micoplasma.

2.1. PCR para *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*

Foram utilizados iniciadores senso e anti-senso específicos de micoplasmas (Tab. 8), sendo as estirpes de MG vacinais (*MGF-Vax* e MG70-*MycoGalli*) e de antígeno colorido MS (MS-Ag SAR/Salsbury®) utilizados como controles positivos.

A PCR foi preparada em microtubo com: 34,75µL de água Mili-Q; 5,0µL de tampão PCR 10X; 2,0µL de MgCl2 (50mM); 1,0 L de dNTP mix, 1,0µL de cada iniciador, 5,0µL de amostra de DNA e 0,25µL (5U/µL) de *Taq* Polimerase, em um volume final de 50µL.

A PCR foi realizada em termociclador *Axygen-Maxygene*®. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de 94ºC por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, cada ciclo com desnaturação a 94ºC por 1 minuto, anelamento a 55ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 2 minutos; sendo um ciclo de extensão final a 72ºC por 10 minutos.

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al*. (1977). Uma alíquota de 100 ng do produto de PCR purificado foi utilizada em cada reação de sequenciamento. Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti senso, foi utilizado o programa Phred (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/), segundo EWING e GREEN (1998). Todas as sequências finais geradas foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information*, conforme descrito por ALTSCHUL *et al*.(1997). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6, sendo que todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente usando versão 7.0 do Bioedit (HALL, 1999). Os alinhamentos de nucleotídeos dos produtos analisados neste trabalho foram utilizados para a construção de árvores filogenéticas com o auxílio do programa MEGA® 5.0 (www.megasoftware.net).

2.2. Inoculação em ovos embrionados

As 15 estirpes de MGN que foram caracterizadas pela tipagem genotípica e estocadas à -60ºC foram descongeladas, e imediatamente inoculadas em 2 mL de caldo de Frey que continha arginina até a alcalinização do meio e viragem do pH. As amostras foram quantificadas por leitura da DO em espectrofotômetro (*NanoDrop* 1000®), em comprimento de onda de 540 nm. Uma alíquota foi diluída, de modo a produzir inóculos de 10^6 UFC-MGN/0,1mL.

Segundo POWER e JORDAN (1976), em avaliação de amostras de MGN em galinhas, perus, culivos de traqueia e ovos embrionados em diferentes idades de desenvolvimento embrionário e temperatura de incubação, optou-se pelo modelo biológico de ovos embrionados SPF para determinação da patogenicidade das estirpes.

Em fluxo laminar, oito ovos SPF (*Specific Pathogen Free* - livres de patógenos específicos) com 12 dias de incubação foram desinfetados com tintura de iodo (5%) e divididos em placa de Petri estéril. Em seguida, foram inoculados 100 µL, via saco da gema, em cada ovo. Os ovos foram incubados a 37ºC e então a ovoscopia foi

realizada até o 19º dia de incubação. Neste dia, os embriões foram eutanasiados pelo método de resfriamento rápido a -20ºC/60min e então, o líquido corio-aloantóide e do saco da gema foram colhidos para PCRs IGRS, MG e MS e teste de aerobiose em placa de ágar sangue desfibrnado, incubaa por 24h à 37ºC.

2.3. Histopatologia dos tecidos de embriões SPF

Foram feitos cortes histopatológicos dos tecidos dos embriões de galinha SPF não inoculados (n=8), inoculados com meio de Frey (n=8) e inoculados com MGN (8x8). Os embriões que apresentaram morte precoce foram coletados para avaliação histopatológica, bem como os viáveis, que foram eutanaziados aos 19 dias. Fragmentos de traqueia, pulmão, coração e fígado foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, submetidas à microtomia de 4µm e coloração pela técnica da hematoxilina-eosina – HE (PROPHET *et al*., 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 9 sumariza os escores das alterações histopatológicas observadas em cada órgão nos grupos experimentais. Os 13 embriões inoculados com MGN que apresentaram morte precoce foram avaliados e foi observado infiltrado inflamatório misto, composto por macrófagos linfócitos e heterófilos, sendo a associação com depósito de fibrina observada em três de13 embriões. Infiltrado inflamatório mononuclear intenso multifocal a difuso foi observado em seis de 13 embriões e infiltrado monocluclear multifocal discreto observado em três de 13 embriões. Grande quantidade de leucócitos estava presente dentro dos vasos sanguíneos ou cavidades cardíacas em dois embriões. Não foi observada nenhuma alteração inflamatória significativa em tecidos de um de 13 embriões. As alterações inflamatórias observadas nos aves com morte embrionária precoce foram sugestivas de um processo infeccioso bacteriano.

Foram analisadas as sequências de nucleotídeos dos amplicons obtidos de 15 estirpes MGN de galinhas da avicultura industrial. No grupo de poedeiras do Espírito Santo (ES), todas as aves apresentavam sinais de doença respiratória, sendo que em 8 de 12 (66,6%) das aves testadas foram detectados

amplicons do MGN. No exame clínico macroscópico à necropsia, todas apresentaram lesões anatomopatológicas sugestivas de coriza infecciosa das galinhas: estertores, descargas nasal contínua, inchaço dos seios infra orbitais, tampão caseoso nas vias nasais e aerosaculite.

G	T	P	F	C
G -I	0,00 0/0	0,00 0/0	0,00 0/0	0,0 0/0
G-MF	0,00 0/0	0,00 0/0	0,50 2/4	0,0 0/0
G1 - 630	0,00 0/0	0,50 2/4	1,00 4/4	0,0 0/0
G2 - 633	0,25 1/4	0,75 3/4	0,5 2/4	0,00 0/0
G3 - 634	0,00 0/0	1,00 3/3	0,75 3/4	0,25 1/4
G4 - 635	0,00 0/0	0,25 2/4	0,50 2/4	0,00 0/0
G5 - 675	0,00 0/0	0,00 0/0	0,33 1/3	0,00 0/0
G6 - 676	0,25 1/4	0,25 1/4	0,50 2/4	0,00 0/0
G7 - 686	0,50 2/4	0,75 3/4	0,50 2/4	0,00 0/0
G8 - 687	0,25 1/4	0,67 2/3	0,25 1/4	0,00 0/0
$\bar{X}$	0,18	0,46	0,48	0,03

Tabela 9. Frequência média das alterações inflamatórias observadas em cada embrião de galinhas incubado/não inoculado, inoculado com meio de Frey e inoculados com MGN mortos ou eutanaziados aos 19 dias de incubação.

I= incubado / não inoculado; MF=meio de Frey;T=traqueia, P=pulmão; F=fígado; C=coração.

Figura 4.Efeito de nanismo e“encurvamento” embrionário em ovo SPF.

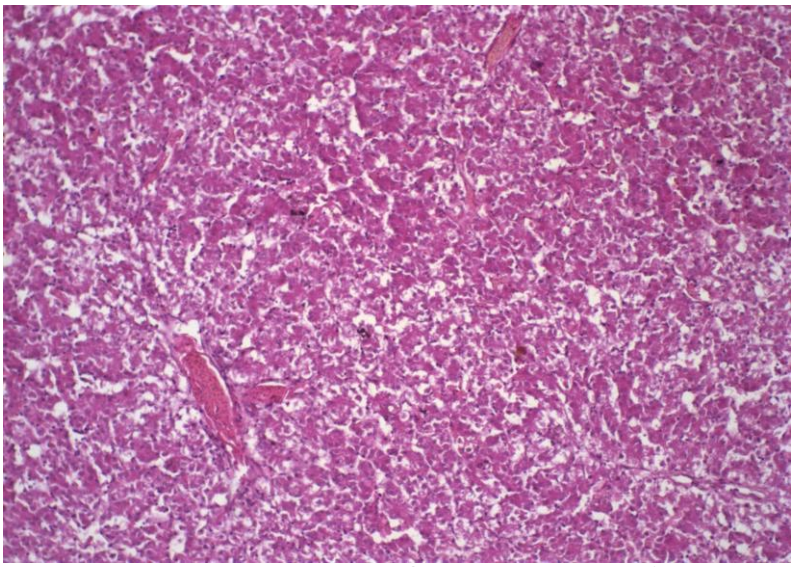


Figura 5. Histopatologia (HE) de Fígado (100x) - Hiperemia difusa

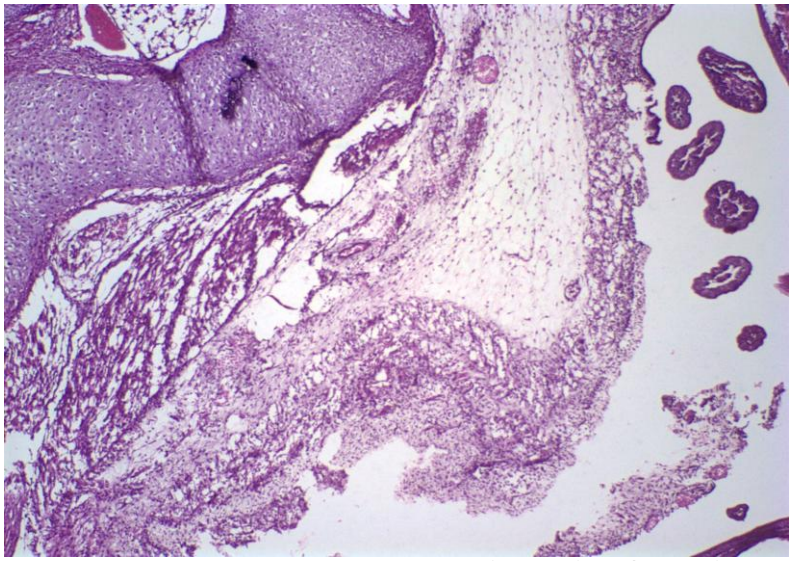


Figura 6. Histopatologia (HE) de Pulmão (400x) –Infiltrado inflamatório multifocal

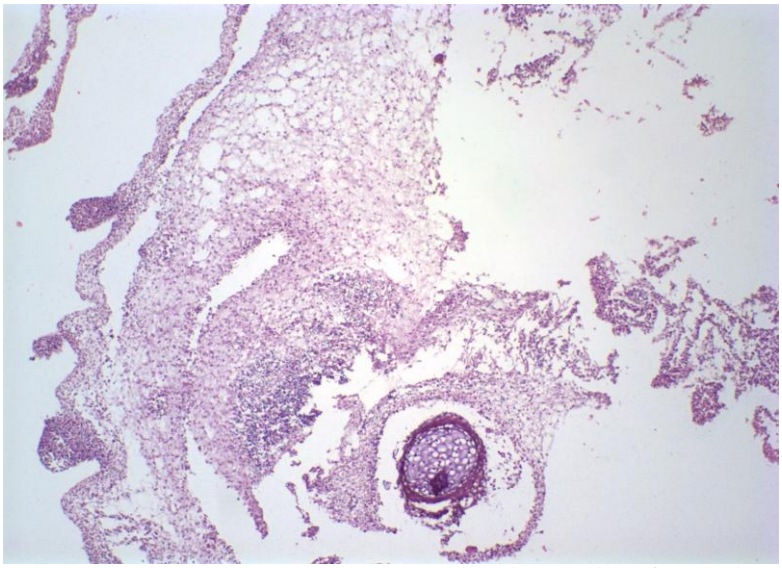


Figura 7. Histopatologia (HE) de Pulmão (100x) – Infiltrado inflamatório multifocal

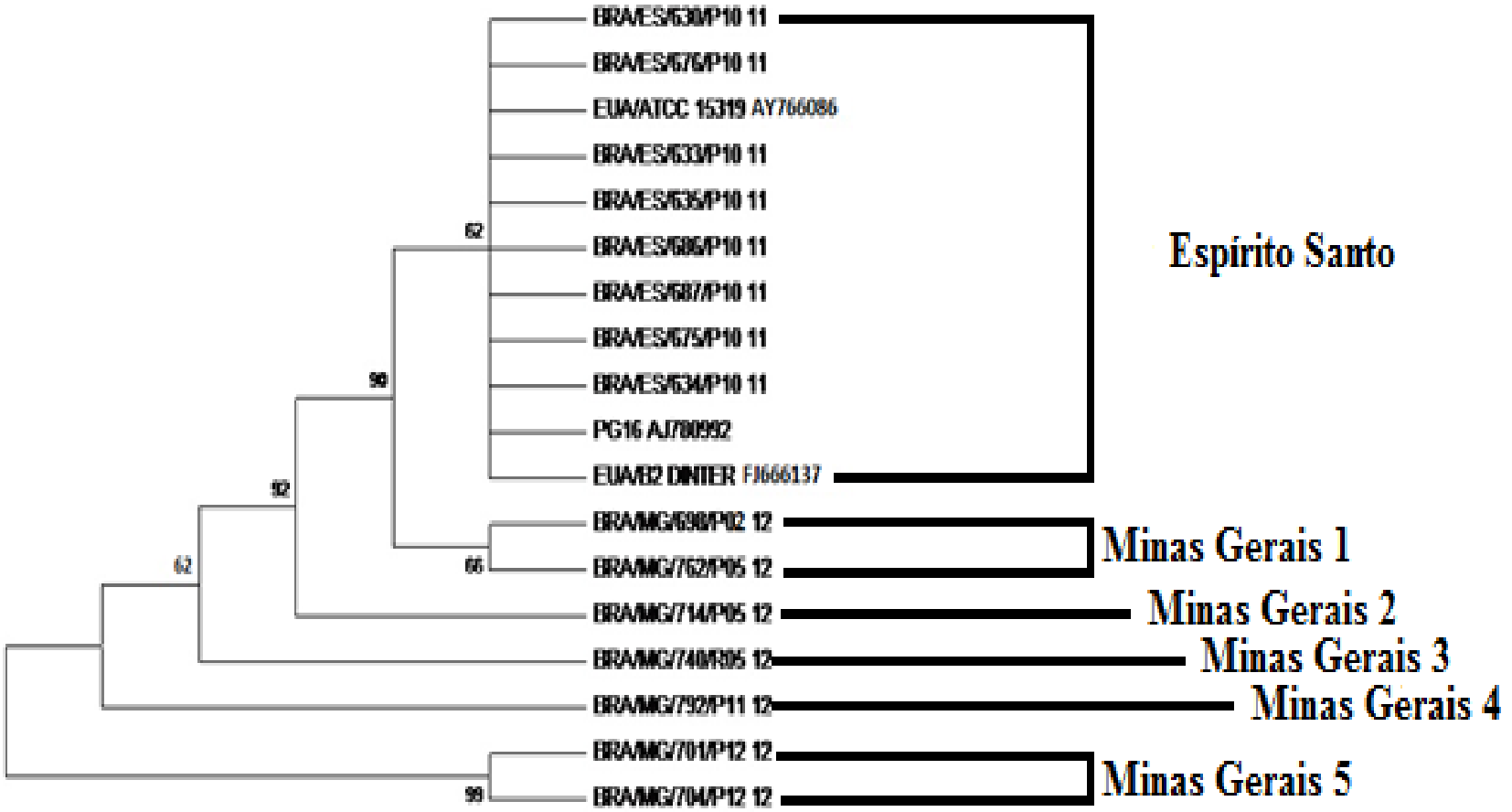


Figura 8. Relação filogenética entre estirpes de *Mycoplasma gallinarum* (MGN) de poedeiras (P) e de um reprodutor (R) pelo método *Neighbor-Joining* com teste de confiança da topologia com reamostragem de 1000-bootstrap. Os números de acesso ao GenBank foram citados para cada sequência de referência (significância >60).

Dados soro-epidemiológicos de MG e MS negativos das 12 aves do ES foram registrados, bem como a informação de não circulação de estirpe vacinal de MG neste estabelecimento avícola. Posteriormente, estes dados foram confirmados pelos resultados negativos de SAR em placa e PCRs específicas para MG/ MS, em soros e nas traqueias, respectivamente.

No grupo controle para a construção da árvore filogenética e estudo da epidemiologia molecular, foi utilizado um grupo de poedeiras hígidas. No grupo de poedeiras de Minas Gerais, sete de 71 (9,9%) amostras foram positivas para MGN. Todas foram negativas para as PCRs específicas para MG e MS.

Para a construção da árvore filogenética, foram escolhidas três sequências de nucleotídeos de estirpes de MGN depositadas no GenBank, na perspectiva de estabelecer relação epidemiológica entre elas e as 15 sequências obtidas neste estudo (Fig. 4)

A análise filogenética permitiu estabelecer relação epidemiológica do grupo de MGN do ES com a sequência de nucleotídeos da estirpe ATCC 15319 acessada no GenBank. Segundo o histórico de isolamento desta estirpe, relatado por VOLOKHOV *et al*. (2006), ela foi isolada do trato respiratório de frangos com doença respiratória semelhante à coriza, em Cambridge (Inglaterra). Apesar da estirpe ATCC 15319 não ter relação geográfica com os isolados do Estado do Espírito Santo, estão agrupadas no mesmo ramo da árvore filogenética (Fig. 8).

Segundo POWER e JORDAN (1976), outros métodos de investigação de letalidade de estirpes MGS são de elevado custo e de menor sensibilidade que inoculação em ovos embrionados SPF. Além destes aspectos considerados, observou-se que o método escolhido demonstrou-se ser de alta sensibilidade na detecção de MGN pela PCR-IGRS, tanto no líquido cório-alantóide (LCA) e sacos da gemas, (LSG) sendo que para a técnica não houve diferença qualitativa entre os dois espécimes na detecção do MGN. Todas as 15 estirpes de MGN foram positivas na PCR-IGRS para LCS E LGS, confirmando a colonização de MGN *in ovo* já descritas em inoculações experimentais por SHAH-MAJID (1994). As amostras foram negativas para estes mesmos espécimes clínicos nas PCRs MG e MS de detecção e teste em aerobiose.

A unidade experimental do grupo de estirpes MGN do ES foi constituída por 80 ovos, sendo oito no grupo controle negativo (0,1mL de meio de Frey) e 64 distribuídos entre as oito estirpes de MGN. O resultado demonstrou uma taxa de 20,83% de mortalidade embrionária. Segundo POWER e JORDAN (1976), essa taxa de morte embrionária é concordante com estirpes de MGN considerados não patogênicas.

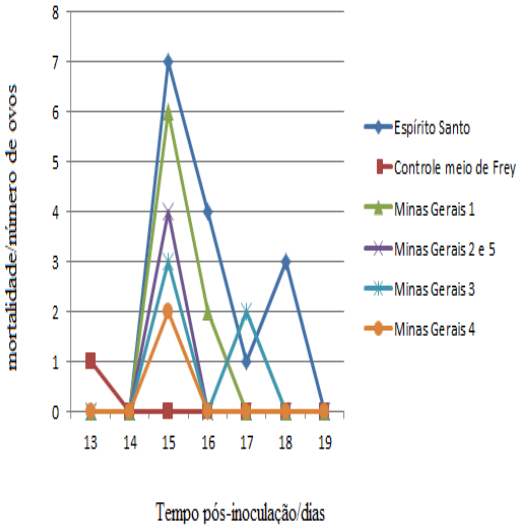
Para o modelo de inoculação em ovos embrionados, quando comparado ao cultivo em anéis de traqueia e inoculação experimental em galinhas ou perus de um dia de vida, o grupo de estirpes de MG do Espírito Santo foi biologicamente caracterizado como sendo de baixa patogenicidade. Quando comparadas as taxas encontradas em estirpes de MG S6, de elevada patogenicidade, poucas passagens (100,0%) e as taxas das estirpes MG S6 atenuadas, de baixa patogenicidade, de muitas passagens (10,0%) encontradas por POWER e JORDAN (1976), podemos inferir que MGN do surto de coriza, isoladamente, não seria potencialmente patogênico.

SHAH-MAJID (1994), ao determinar uma melhor idade para a inoculação do embrião com uma estirpe de MGN, observou que ovos embrionados maduros, aos 18 dias de vida de incubação apresentaram maior capacidade de resistir a infecção de doses próximas a $7,3 \times 10^6$ UFC/mL^{-1}de MG enquanto que embriões muito jovens, aos 5-7 dias de vida de incubação, se mostraram muito sensíveis às doses de 1×10^6 UFC/mL^{-1}, sendo que a padronização da dose/tempo neste estudo foram concordantes com estes achados prévios de inoculação experimental.

No delineamento experimental do estudo, a inoculação de ovos embrionados na idade de 12 dias pareceu ser satisfatória, devido à baixa mortalidade do controle negativo inoculado com 0,1mL de meio de Frey (Fig. 5). Tal achado foi concordante aos resultados prévios encontrados para os ovos não inoculados com estirpes de MGN e MG por POWER e JORDAN (1976) citados por SHAH-MAJID (1994).

Entretanto, a curva de letalidade dos ovos embrionados SPF e os resultados isolados das oito isolados do grupo de estirpes MGN do Espírito Santo demonstraram uma maior mortalidade entre 3º e 4º dias pós-incubação (Fig. 8). As amostras de MGN apresentaram mortalidade de 46,7% (7/15) no 3º dia pós-incubação. Isso poderia indicar perdas consideráveis para o sistema de produção de isolaram MGN no trato reprodutivo de aves: infúdibulo, magno, istmo e glândula da casca, sendo MGN amplamente disseminado entre os órgãos do aparelho reprodutor das aves.

Figura 9. Curva de letalidade das estirpes de *Mycoplasma gallinarum* do estado do Espírito Santo oriundas de poedeiras.



Já DELASMULAS *et al*. (1990) detectaram MGN em cortes histológicos pela técnica de imunohistoquímica nos ovidutos de galinhas naturalmente infectadas, destacando a potencial transmissão via ovo deste agente nas aves hígidas, como também visto neste estudo pela técnica de biologia molecular.

O grupo de poedeiras do Espírito Santo, com sinais de doença respiratória, apresentou taxa de detecção maior (66,6%) do que o grupo de aves hígidas de Minas Gerais (9,9%). Estes dados são concordantes com os descritos por GROSS (1990); NAYLOR *et al*.(1992); NAKAMURA *et al*. (1994), que apontaram as infecções por micoplasma e o sinergismo por bactérias e vírus respiratórios como fatores agravantes e também concordam ao relato de SILVA (2013) para estirpes de MGN em frangos de corte co-infectados com o VBIG.

A análise da relação filogenética demonstrou discreta distância filogenética entre o grupo de estirpes MGN de Minas Gerais. Apesar das estirpes MGN de Minas Gerais apresentarem relação geográfica com as estirpes de MGN do Espírito Santo, este último grupo não apresentou distância filogenética notável entre si.

A infecção da estirpe do grupo de estirpes MGN do ES em sinergismo com a coriza pode ter modificado o grau de patogenicidade dessas estirpes, possivelmente pelos mecanismos de seleção de fenótipos resistentes, que constitui a principal estratégia de sobrevivência dos micoplasmas, tornando-os mais adaptados à microbiota da ave (RAZIN *et al*., 1998).

As comparações dos alinhamentos das sequências de nucleotídeos das estirpes MGN demonstraram que o grupo de três lotes de poedeiras e o lote de reprodutor do grupo do Minas Gerais, apresentaram pequena diferença na análise das sequências de nucleotídeos, o que acarretou a inclusão dessas em ramos diferentes da árvore filogenética e formação de um grupo (Fig. 3).

Sítios de polimorfismos na região IGRS da amostra PG16 (AJ780992) de MGN não foram identificadas por RAMIREZ *et a*l. (2008). Porém, foi observada uma variação no genoma nesta região na posição 81_R na estirpe americana B2/Dinter (FJ666137) utilizada neste estudo, previamente descrito por VOLOKHOV *et al*. (2006), com a substituição de uma base púrica por púrica (A↔G), que não foi encontrada na análise das sequencias de nucleotídeos dos amplicons do grupo de estirpes MGN de Minas Gerais.

Em consideração às diferenças de patogenicidade entre as estirpes MGN autóctones e estirpes MGN associadas à doença respiratória que foram encontradas por SILVA (2013) na fase final da criação de frangos de corte, associada à diversidade de genótipos encontrados nos grupos de Minas Gerais e Espírito Santo, verificou-se a existência de subtipos de MGN. Estes achados reforçam a

indicação de modelos de estudo de patogenicidade para melhor entendimento da importância econômica deste agente para a avicultura industrial de postura.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER, A. A. *et al*. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BASHIRUDDIN, J.B. Extraction of DNA from Mycoplasma. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds). *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v, 104, p. 141-144.

BRADBURY, J.M. Recovery of Mycoplasmas from birds. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds.) *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 45-51.

DELASMULAS, J. M.; FERNANDES, A. SIERRA, M. A. I; *et al*. Immunohistochemical demonstration of *Mycoplasma gallinarum* e *Mycoplasma gallinaceum* in naturally infected hen oviducts. *Research in Veterinary Science*, v. 49, n. 3, p. 339-345, 1990.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, n. 3, p. 186-194, 1998.

GROSS, W. B. Factors affceting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Diseases*, v. 34, n. 3, p. 607-610, 1990.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequencer alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, n. 9, p. 95-98, 1999.

JORDAN, F. T. W. Avian Mycoplasmosis. In: JORDAN, F.T.W. (Ed.) *Poultry diseases*. London: Saunders Company, 1996. 4 ed., p. 81-93.

JORDAN, F. T. W. Avian Mycoplasmas. In: TULLY, J.G. (Ed.) *The mycoplasmas: human and animal mycoplasmas*. New York: Whitcomb Academic Press, 1979, v. 2, p. 1-48.

KLEVEN, S.H; EIDSON, C.S.; FLETCHER, O.J. Airsacculitis induced broilers with a combination of *Mycoplasma gallinarum* and respiratory viruses. *Avian Diseases*, v. 22, n. 4, p. 707-716, 1978.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: KLEVEN, S.H.; LEY, D.H.; CHIN, R.P. *et al*. (Eds.) *Diseases of poultry*. 12 ed. Ames: Iowa State University Press, 2008. p. 805-864.

LAUERMAN, L.H.; HOERR, P.J.; SHARPTON, A.R. *et al*. Development and application of a Polymerase Chain Reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, v. 37, n. 3, p. 829-834, 1993.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. In: AVIAN mycoplasmosis - *Mycoplasma gallisepticum* (2004). 5 ed. Paris: OIE Biological Standards Commission. 2004. v. 2, cap. 2.7.3, p. 842-855.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. In: AVIAN mycoplasmosis - *Mycoplasma synoviae* (2008). 7 ed. Paris: OIE Biological Standards Commission. 2008. v. 2, cap. 2.3.5, p. 482-496.

NAKAMURA, K.; UEDA, H.; TANIMURA, T. *et al*. Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection. *Journal of Comparative Pathology*, v. 111, n. 1, p. 33-42, 1994.

NAYLOR, C.J.; AL-ANKARI, A.R.; AL-AFALEQ, A.I. *et al*. Exacerbation *of Mycoplasma gallisepticum* infection in turkeys by rhinotracheitis virus. *Avian Pathology*, v. 21, n. 2, p. 295-305, 1992.

POVEDA, J.B.; CARRANZA, J.; MIRANDA, A. *et al*. An epizootiological study of avian

mycoplasmas in southern Spain. *Avian Pathology*, v.19, n. 4, p. 627-633, 1990.

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

POWER, J.; JORDAN, F.T.W. A comparation of the virulence of three strains of *Mycoplasma gallisepticum* and one strain of *Mycoplasma gallinarum* in chicks, turkey poults, tracheal organ cultures and embrionated fowl eggs. Research in Veterinary Science, v. 21, n. 1, p. 41-46, 1976.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. *et al*. Laboratory methods in histotechnology. New York: *American Registry of Pathology*, 1992. 279p.

RAMIREZ, A.S., NAYLOR, C.J., PITCHER, D.G. *et al*. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, v. 128, n, 5. p. 279–287, 2008.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasma. *Microbiology Molecular and Biology* Reviews, v. 62. N. 6. p. 1094-1156, 1998.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, C.C. *Qualidade de frangos de corte infectados com Mycoplasma gallinarum isoladamente ou em combinação com a cepa vacinal h120 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.* 2013. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, RJ.

SHAH-MAJID, M. Effect of mixed infection of *Mycoplasma gallinarum* and Newcastle disease virus (F strain) on the tracheal epithelium of village chickens. *Research in Veterinary Science*, v. 61, n. 2, p. 176-178, 1996.

SHAH-MAJID, M. Effect of *Mycoplasma gallinarum* on embryonated village chicken eggs. Research in Veterinary Science, v. 57, n. 3, p. 390-392, 1994.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of molicutes in molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. In: RAZIN, S; TULLY, J. G., (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995a. v. 1, p. 33-39.

TULLY, J.G. Cloning and filtration tecnhiques for mycoplasmas: mycoplasma. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995b. v. 1, p. 173-177.

VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X. *et al*. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.71, n.5, p. 680-698, 2006.

WANG, Y.; WHITHEAR, K.G.; GHIOCAS, E. Isolation of *Mycoplasma gallinarum* and *M. gallinaceum* from the reproductive tract of hens. *Australian Veterinary Journal*, v. 67, n. 1, p. 31-32, 1990.

CAPÍTULO III

ESTUDO FILOGENÉTICO DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* DE GALINHAS NA AVICULTURA INDUSTRIAL DE MINAS GERAIS

[*Phylogenetic analysis of Mycoplasma gallisepticum in chickens of the poultry industry in Minas Gerais – Brazil*]

RESUMO

Foram realizados PCR e sequenciamento genético de estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) de 4 lotes de galinhas poedeiras (n=83), um lote de frango de corte (n=21) e um lote de reprodutores (n=18). As sequências de nucleotídeos foram obtidas de suabes de traqueia em caldos de Frey seletivo-indicador modificado (0.3% de glicose; 0.1% de L-cisteína e 12% de soro equino), incubadas a 37^{o}C em microaerofilia, até viragem do vermelho de fenol por 144 horas. Para a PCR MG de detecção foram desenhados pares de iniciadores específicos previamente descritos pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) para diagnóstico molecular de MG e posteriormente, o sequenciamento do amplicon da região transcrita do espaço intergênico (IGRS) entre 16S e 23S do RNA ribossomal. A tipagem genotípica evidenciou o agrupamento das estirpes MG de galinhas poedeiras, frangos de corte e reprodutores com três estirpes vacinais de MG, sendo uma estirpe brasileira (MG70) e duas estirpes americanas (MGF e MGR), que são amplamente utilizadas como vacinas em poedeiras comerciais.

ABSTRACT

PCR and genetic sequencing were performed on strains of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) of from four flocks of laying hens, one flock of breeders and two flocks of broiler chickens (n=122). Nucleotide sequences of the strains were obtained of the tracheal swabs cultured in Frey's broth (0,3% glucose, 0,1% L-cysteine and 12% horse serum) . The samples were incubated in microaerophilic conditions until the turn of color by phenol red for 24/24 hours. The direct detection of *Mycoplasma gallisepticum* genome strains was performed using primers designed by the International Organization for Animal Health (OIE). The analyses of nucleotides sequences in the transcribed region of the 16S and 23S intergenic ribosomal RNA space (IGRS) were used in molecular characterization of MG strains. The genotyping of MG strains clustered in the flocks of laying hens and breeders of the analyses of nucleotides sequences with MGF, MG70 and MGR nucleotides sequences of commercials vaccine of the Brazilian poultry industry.

1. INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) está entre os mais importantes patógenos bacterianos, responsável pelas doenças respiratórias crônicas (DRC) nas galinhas e outras espécies domésticas, causando aerossaculite, conjuntivite, deformidade esquelética, salpingite, pododermatite, infertilidade, baixa eclodibilidade e artrite em galinhas, e sinusite infecciosa em perus, com alta mortalidade embrionária e condenação das carcaças (LEY, 2003).

As repercussões da infecção por MG quando em co-infecção com vírus, como a broquite infecciosa das galinhas, doença de Newcastle, laringotraqueíte, anemia das galinhas, reoviroses e bactérias como *Escherichia coli* e *Mycoplasma synoviae* são muito graves. A atuação sinérgica destes patógenos, os fatores ambientais adversos, a criação intensificada e a maior susceptibilidade genética aumentam a morbidade e mortalidade (LEY 2003; KLEVEN, 2008).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), em colaboração com as associações de avicultura, estabelece a obrigatoriedade da erradicação do MG dos plantéis de reprodutores e produção de ovos férteis (BRASIL, 2001).

O distanciamento de plantéis reprodutores de plantéis de status sanitário desconhecido deve ser observado (BRASIL, 1994; CERDÁ, 2007; NASCIMENTO E PEREIRA, 2009). A maior frequência de transmissão *in ovo* ocorre durante a fase aguda da micoplasmose e em menor taxa durante a fase crônica da doença (GLISSON E KLEVEN, 1985).

A região transcrita não codificada do espaço intergênico (IGRS) entre 16S e 23S do RNA ribossomal constitui sequência hiper variável do genoma do micoplasma, permitindo a diferenciação entre as estirpes de MG selvagens e vacinais, auxiliando na epidemiologia molecular de *Mycoplasma gallisepticum* (HARASAWA, 1999; VOLOKHOV *et al*., 2006; RAVIV *et al*.,2007; GHARAIBEH *et al*., 2011).

Com relação aos genes de proteínas de superfície ($P^{V}P^{A}$, *MGC1, MGC2, MGC3*), o genoma do MG possui sistema complexo de regulação, embora com a deficiência do sistema de reparo do DNA, tornando os micoplasmas mais susceptíveis às mutações (WOSE *et al*.,1985).

Sob pressão de seleção, o conjunto de genes de proteínas de superfícies de MG pode apresentar variação na expressão e estrutura dos seus produtos específicos, as quais correspondem aos principais mecanismos de virulência e patogenicidade (GOH *et al*., 1998; HANATOW *et al*., 1998; BOGUSLAVSKY *et al*, 2000).

Um dos mecanismos de controle mediado por vacinação de poedeiras com estirpes de vacinas vivas em poedeiras, por exemplo, das estirpes MGF (Conn-F), ts-11 ou 6/85 baseia-se na exclusão competitiva das estirpes selvagens. A estirpe mutante atenuada vacinal MGF, por apresentar potencial de transmissibilidade, patogenicidade e de reversão de virulência pode causar doença respiratória em poedeiras sensíveis. A estirpe MGF está descrita como agente etiológico da doença clínica em galinhas e perus, com a transmissão para aves não vacinadas alojadas em galpões próximos a núcleos vacinados (LEY *et al*., 1993; RAZIN *et al*., 1998; NASCIMENTO e PEREIRA, 2009; GHARAIBEH *et al*, 2011).

O método de tipagem genotípica pelo sequenciamento genético teria um índice discriminatório satisfatório no agrupamento de estirpes semelhantes de regiões geográficas distintas e demonstraria precisamente as distâncias filogenéticas entre as estirpes distintas (selvagens *versus* vacinais).

Este trabalho teve como objetivo pesquisar a presença de micoplasmas, pela detecção e sequenciamento genômico, sendo suas relações moleculares evolutivas e filogenéticas avaliadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os suabes de traqueia foram coletados de frangos de corte (n=9) da região de Igaratinga/Minas Gerais e agitados em microtubos com 1,5mL de caldo de Frey modificado para pré-enriquecimnento de MG e inibição de bactérias contaminantes (ZAIN e BRADBURY, 1996). Estes foram incubados para pré-enriquecimento em meio de por até 144 h em condições de microaerofilia a 37ºC e a modificação da cor pela acidificação do meio, foi sugestiva de crescimento. Como controle positivo do crescimento bacteriano foram utilizadas estirpes comerciais de vacinas vivas de MG (*MGF-Vax* e MG70-*MycoGalli*), respectivamente uma estirpe americana e brasileira, das empresas *Schering Plough*® (Kenilworth, New Jersey) e *Biovet*® (Vargem Grande Paulista, São Paulo).

Os suabes foram inoculados em 1,5 mL de caldo de Frey, segundo TULLY (1995a). O caldo foi filtrado através de membrana Millipore® de 0,45 µm de poro (TULLY, 1995b) e a ausência de micro-organismos aeróbios foi confirmada em placa de sangue desfibrinado, incubadas por 24h a 37 ºC.

As amostras pré-enriquecidas foram extraídas pelo método de fervura-congelamento rápidos padronizado pela OIE (MANUAL, 2004) e modificado por BASHIRUDDIN (2010).

Foram utilizados iniciadores senso e anti-seno universal e específico para detecção do genoma do *Mycoplasma gallisepticum* (Tab. 10). Os controles positivos das PCRs foram as estirpes de vacinas comerciais de MG (*MGF-Vax* e MG70-*MycoGalli*).

A PCR-IGRS de sequenciamento foi realizada em termociclador *Axygen-Maxygene*®/EUA, utilizando uma alíquota de 1,0 µL de cada amostra de DNA. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de 94ºC por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, cada ciclo com desnaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 55ºC por 30 segundos e extensão a 72ºC por 60 segundos; sendo um ciclo de extensão final a 72ºC por 5 minutos.

A PCR para detecção de MG foi preparada em microtubo com: 34,75µL de água Mili-Q; 5,0µL de tampão PCR 10X; 2,0µL de MgCl2 (50*m*M); 1,0µL de dNTP mix, 1,0µL de cada iniciador, 5,0µL de amostra de DNA e 0,25µL (5U/µL) de *Taq* Polimerase, em um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de 94ºC por 5 minutos, seguida por 40 ciclos, cada ciclo com desnaturação a 94ºC por 1 minuto, anelamento a 55ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 2 minutos; sendo um ciclo de extensão final a 72ºC por 10 min.

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al*. (1977). Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti senso, foi utilizado o programa Phred®(http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/), segundo EWING e GREEN, (1998). Segundo ALTSCHUL *et al*. (1997), todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information*(NCBI - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). O algoritmo BLASTn(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) dopacote BLAST 2.0® (*Basic Local Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo NCBI foi utilizado para a busca de similaridade entre os nucleotídeos

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 do Molecular Evolutionary Genetics Analysis® (MEGA 5.0/ www.megasoftware.net) e os alinhamentos foram revisados e editados manualmente usando versão 7.0 do Bioedit® (HALL, 1999). Posteriormente, foram calculados os percentuais de caracteres distintos ou dissimilares entre as estirpes de MG, proposto por KIMURA, (1980) e TAMURA *et al*. (2011).

Tabela 10. Iniciadores universal e específico utilizados nas PCRs IGRS de sequenciamento e MG de detecção.

Iniciador	Sequência	Produto (pb)	Referência
IGRSF	5'GTAGGGCCGGTGATTGGAGTTA3´	645	LAUERMAN et al. (1995)
IGRSR	3'TAGGGCCGGTGATTGGAGTTA5'		
MG-14F	5´GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3`	185	OIE, 2004
MG-13R	5'GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC3'		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A árvore filogenética foi construída a partir de 14 sequências de nucleotídeos de estirpes de MG, sendo nove estirpes de campo divididas em três grupos oriundos de: frangos de corte (BRA/MG/780/FC1012, BRA/MG/786/FC1012, BRA/MG/788/FC1012), poedeiras (BRA/MG/562/P0511, BRA/MG/563/P0511, BRA/MG/564/P0511) e reprodutores (BRA/MG/494/R0511, BRA/MG/628/R0911, BRA/MG/629/R0911.

Neste estudo, também foram sequenciadas três amostras de vacinas (BRA/MG70/VAC1, EUA/MGR/VAC2 e EUA/MGF/VAC3), uma originária do Brasil, e duas dos Estados Unidos e duas dos Japão (JAP/REF1 e JAP/S6/REF2). Para a comparação dos resultados das sequências obtidas, foram utilizadas sequências da região transcrita do espaço intergênico (IGRS) entre 16S e 23S do RNA ribossomal depositadas no GenBanK de estirpes de MG dos Estados, EUA/F/CK58(HQ143383); Jordânia, JOR/4/CK05(HQ143385), JOR/83/CK08 (HQ143386); Egito EGY/67240/CK08(HQ143380), EGY/75651/CK09(HQ143381), EGY/ 82129/CK10(HQ143382) e Israel, ISR/K38a68/CK95 (HQ143384).

As três sequências de nucleotídeos dos frangos de corte BRA/MG/780/FC1012, BRA/MG/786/FC1012, BRA/MG/788/FC1012 foram similares às sequências descritas para a estirpe vacinal americana MGF (EUA/MGF/VAC3) e de estirpes internacionais EUA/F/CK58, também vacinal, dos Estados Unidos e JOR/4/CK05, representante de grupo de frangos da Jordânia (Fig. 6).

As sequências de nucleotídeos de MG de origem potencialmente vacinal foram obtidas de doença respiratória grave em frango de corte. A patogenicidade da estirpe MGF para frangos de corte foi descrita previamente para frangos de corte (RODRIGUEZ e KLEVEN, 1980), sendo a possibilidade de ganho de virulência descrita após múltiplas passagens em aves (LIN e KLEVEN, 1984).

Os resultados sugerem a necessidade de implementação de estratégias rigorosas de biosseguridade para a prevenção da transmissão entre lotes vacinados para não vacinados, tendo em vista a maior suscetibilidade de aves jovens e o possível ganho de virulência das estirpes MGF (GHARAIBEH *et al*., 2011), pois a estirpe MGF podem ser potencialmente transmissível de galinhas vacinadas para não vacinadas, mantidas em compartimentos adjacentes e podem ser reisoladas muito tempo após a vacinação do lote (KLEVEN, 1981).
Sequências de nucleotídeos de referência japonesas (JAP/REF; JAP/S6/REF2) e vacinal BRA/MG70/VAC1 foram similares as sequência BRA/MG/562/P0511; BRA/MG/563/P0 511; BRA/MG/564/P0511 de poedeiras e BRA/MG/493/R0511; BRA/MG/494/R0511 de reprodutores, cujas sequências foram analisadas em episódio anterior de doença respiratória natural (Fig. 6).

O sequenciamento genético alvo neste estudo possibilitou a comparação de estirpes vacinais de MG de frangos, com as de poedeiras

comerciais e reprodutores com as estirpes selvagens de diferentes partes do mundo disponibilizadas no GenBank.

A Tabela 11 demonstra os percentuais de similaridades inferiores a 96,4% corresponderem a amostras diferentes entre si. O resultado calculado pelo Clustal-W foi conforme o esperado. GHARAIBEH *et al*. (2011), quando compararm estirpes da Jordânia, que a apresentavam relação geográfica (JOR/83/CK08 versus JOR/4/CK05), em períodos distintos, obteve uma taxa de similaridade de 96,4%, e portanto diferenciou a primeira em estirpe MG selvagem e a segunda em vacinal, respectivamente.

Embora a vacinação com estirpe vacinal viva seja um método útil e eficaz na redução das perdas econômicas por MG em poedeiras comercias (FERGUSSON *et al*., 2004), a intensificação da avicultura da região provocou a proximidade entre lotes de poedeira e frangos de corte (LEY *et al.*, 1993; citados por GHARAIBEH *et al*., 2011). Os autores descreveram a proximidade de lotes um fator de susceptibilidade às infecções por estirpes MG vacinais, bem como a circulação da estirpe MGF parece atuar como infecção oportunista e sinérgica em doença respiratória em frangos de corte, potencialmente desencadeada por infecção vacinal com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas da estirpe Massachusetts N-120. ´

METTIFOGO *et al*. (2006), ao realizarem a caracterização molecular de isolados de galinhas nos estados do Paraná e Santa Catarina, comprovaram uma relação geográfica e temporal muito semelhantes ao encontrado neste estudo. Nos dois estudos, as estirpes que demostraram maior ancestralidade com a estirpe MGF vacinal foram as dos sistemas de produção de maior trânsito, provavelmente, o do grupo dos frangos de corte. As estirpes MG das poedeiras e reprodutores se mantiveram mais distantes da estirpe MGF vacinal, como demonstrado nos dois estudos (Fig. 6). No caso da caracterização molecular das estirpes de MG isoladas de incubatórios do Paraná, 6/16 estirpes de MG foram agrupadas distantes das estirpes F, ts-11 e R e S6 de MG.

Na tipagem genotípica das estirpes MG vacinais da avicultura industrial de Minas Gerais, estas não apresentam relação geográfica com as estirpes S6 de referência japonesas, chinesa e australiana (JAP/REF1; JAP/S6/REF2; CHI/S6/CK/10; AUS/S6/CK/13). É possível que uma das estirpes de referência japonesas sequenciadas neste estudo tenha sido erroneamente tipada e rotulada como S6, pois foi oriunda de antígeno colorido para SAR que, no caso apresentou identificação genotípica discrepante. Observa-se na arvore filogenética uma dicotomia na classificação desta estirpe, fato este não foram encontrado por RAVIV *et al*. (2007) e GHARAIBEH *et al*. (2011).

Um fato relevante se refere ao número de passagens em meios de cultura estático ou em tanques de fermentação em batelada das amostras na indústria de imunobiológicos para o fabrico de vacinas e antígenos coloridos. RAVIV *et al*. (2007) analisaram as sequências de nucleotídeos da região IGRS de estirpes S6 de *Mycoplasma gallisepticum*, em 15, 21 e 29 níveis de passagem *in vitro* em meio de cultura, e verificaram que as sequências foram 100% idênticas. O sequenciamento de nucleotídeos da região IGRS dos caldos de pré-enriquecimento purificados demostrou ser estável em repetidas PCRs de sequenciamento das estirpes de MG empregadas como controles positivos e espécimes clínicos.

Conforme mostrado na Figura 6, a estirpe de MG PG31 (AB098504) foi agrupada com a EUA/MGR/VAC2, em concordância com o desenho da árvore filogenética proposta por RAVIV *et al*. (2007) para uma estirpe R de MG de poucas passagens. Neste estudo, observa-se (Fig. 6) o agrupamento de duas estirpes de MG de reprodutores (BRA/MG628/R0911; BRA/MG628/R0911). Estas estirpes não apresentaram estudos de virulência consistentes, como as MGF, ts-11 e 6/85 (FERGUSSON *et al*., 2004). Tal fato, torna preocupante a circulação desta estirpe neste sistema de produção.

O método de diferenciação pelo sequenciamento genético demonstrou bom potencial

discriminatório, permitindo diferenciar estirpes independentes, e ainda possibilitou demonstrar a relação das estirpes através de fonte comum e geograficamente distintas.

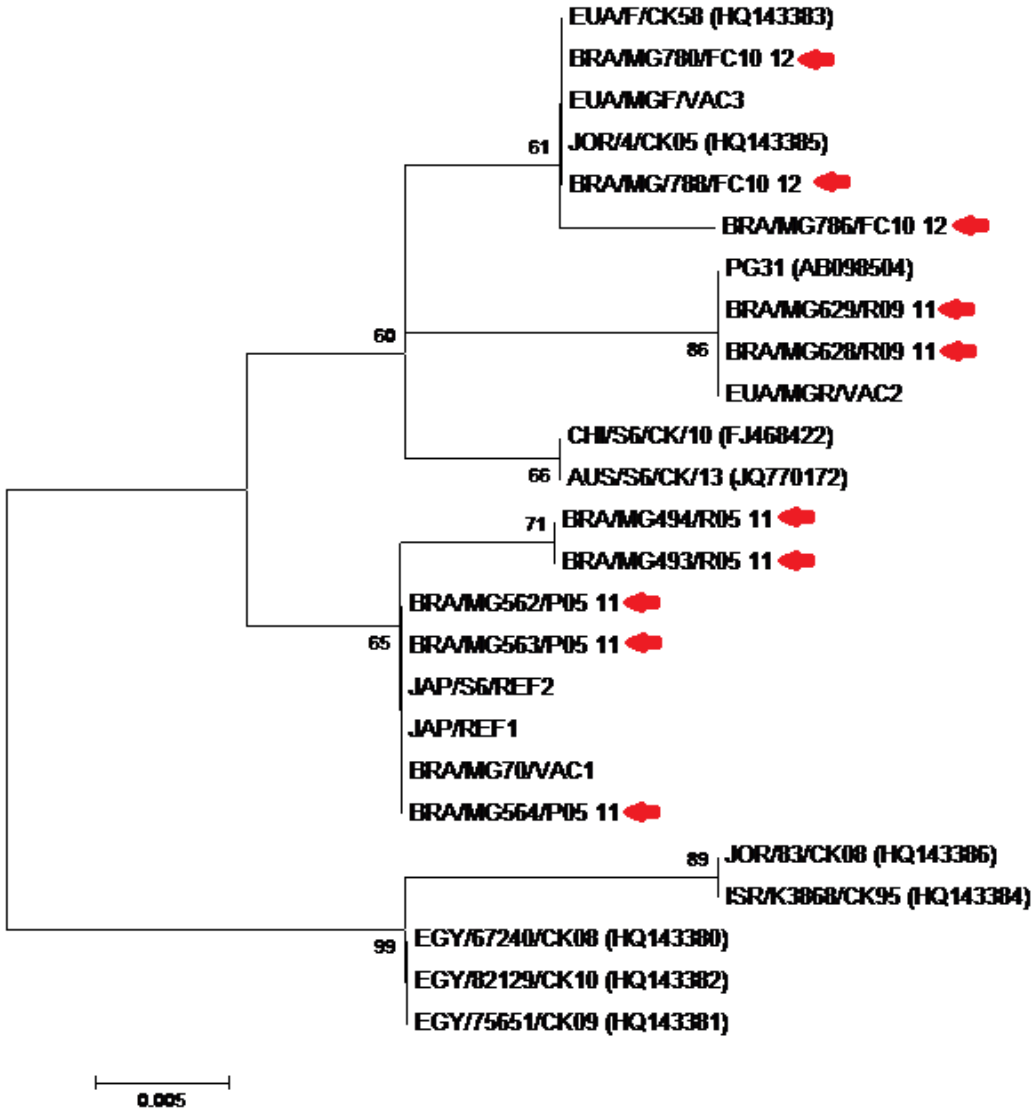


Figura 6. Relação filogenética entre estirpes de *Mycoplasma galliseptium* (MG) de poedeiras (P), frangos de corte (FC) e reprodutores (R) pelo método *Neighbor-Joining* com teste de confiança da topolologia com reamostragem de 1000-bootstrap. Número de acesso ao GenBank foram citados para cada sequência de referência. Amostras de campo obtidas no estudo (setas em vermelha).

Estirpes de *M. gallisepticum*	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
A. CHI/S6/CK/10_(FJ468422)	ID																								
B. AUS/S6/CK/13_(JQ770172)	100.0	ID																							
C. PG31_(AB098504)	98.2	98.2	ID																						
D.JOR/83/CK08_(HQ143386)	95.2	95.2	94.6	ID																					
E. JOR/4/CK05_(HQ143385)	98.8	98.8	98.2	95.2	ID																				
F. JAP/S6/REF2	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	ID																			
G. JAP/REF1	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	100.0	ID																		
H. ISR/K3868/CK95_(HQ143384)	95.2	95.2	94.6	100.0	95.2	95.8	95.8	ID																	
I. EUA/MGF/VAC3	98.8	98.8	98.2	95.2	100.0	98.2	98.2	95.2	ID																
J. EUA/F/CK58_(HQ143383)	98.8	98.8	98.2	95.2	100.0	98.2	98.2	95.2	100.0	ID															
K. EGY/82129/CK10_(HQ143382)	96.4	96.4	95.8	98.8	96.4	97.0	97.0	98.8	96.4	96.4	ID														
L. EGY/75651/CK09_(HQ143381)	96.4	96.4	95.8	98.8	96.4	97.0	97.0	98.8	96.4	96.4	100.0	ID													
M. EGY/67240/CK08_(HQ143380)	96.4	96.4	95.8	98.8	96.4	97.0	97.0	98.8	96.4	96.4	100.0	100.0	ID												
N. BRA/MG70/VAC1	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	100.0	100.0	95.8	98.2	98.2	97.0	97.0	97.0	ID											
O. BRA/MG786/FC10_12	98.2	98.2	97.6	94.6	99.4	97.6	97.6	94.6	99.4	99.4	95.8	95.8	95.8	97.6	ID										
P. BRA/MG780/FC10_12	98.8	98.8	98.2	95.8	100.0	98.2	98.2	95.2	100.0	100.0	96.4	96.4	96.4	98.2	99.4	ID									
Q. BRA/MG629/R09_11	98.2	98.2	100.0	94.6	98.2	97.6	97.6	94.6	98.2	98.2	95.8	95.8	95.8	97.6	97.6	98.2	ID								
R. BRA/MG628/R09_11	98.2	98.2	100.0	94.6	98.2	97.6	97.6	94.6	98.2	98.2	95.8	95.8	95.8	97.6	97.6	98.2	100.0	ID							
S. BRA/MG564/P05_11	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	100.0	100.0	95.8	98.2	98.2	97.0	97.0	97.0	100.0	97.6	98.2	97.6	97.6	ID						
T. BRA/MG563/P05_11	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	100.0	100.0	95.8	98.2	98.2	97.0	97.0	97.0	100.0	97.6	98.2	97.6	97.6	100.0	ID					
U. BRA/MG562/P05_11	98.2	98.2	97.6	95.8	98.2	100.0	100.0	95.8	98.2	98.2	97.0	97.0	97.0	100.0	97.6	98.2	97.6	97.6	100.0	100.0	ID				
V. BRA/MG494/R05_11	97.6	97.6	97.0	95.2	97.6	99.4	99.4	95.2	97.6	97.6	96.4	96.4	96.4	99.4	97.0	97.6	97.0	97.0	99.4	99.4	99.4	ID			
W. BRA/MG493/R05_11	98.2	97.6	97.0	95.2	97.6	99.4	99.4	95.2	97.6	97.6	96.4	96.4	96.4	99.4	97.0	97.6	97.0	97.0	99.4	99.4	99.4	100.0	ID		
X. BRA/MG/788/FC10_12	98.8	98.8	98.2	95.2	100.0	98.2	98.2	95.2	100.0	100.0	96.4	96.4	96.4	98.2	99.4	100.0	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	97.6	97.6	ID	
Y. EUA/MGR/VAC2	98.2	98.2	100.0	94.6	98.2	97.6	97.6	94.6	98.2	98.2	95.8	95.8	95.8	97.6	97.6	98.2	100.0	100.0	97.6	97.6	97.6	97.0	97.0	98.2	ID

Tabela 11. Percentual de similaridade (%) entre as sequências de nucleotídeos da região IGRS das estirpes de *Mycoplasmas gallisepticum* deste estudo comparativo com as disponibilizadas no GenBank.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER, A. A. *et al*. Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BASHIRUDDIN, J.B. Extraction of DNA from Mycoplasma. In: MILES, R.; NICHOLAS, R., (Eds.) *Mycoplasma protocols*: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 141-144.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa DAS/nº44 de 23 de agosto de 2001. Aprova sobre as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Micoplasma meleagridis*), em conformidade com os Anexos a essa Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, In: MANUAL de Legislação. Brasília: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, 2009. p. 234-240.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº193 de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, Distrito Federal. 19/09/1994, Seção 1, p.13.

BOGUSLAVSKY, S.D.; MENAKER, I.L.; LYSNYANSKY, I. *et al*. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* $P^{V}P^{A}$ gene wich encodes a putative variable cytadhesin protein. *Infection and Immunology*, v. 68, n. 7, p. 3956-3964, 2000.

CERDÁ, R.O. Medidas de prevención y control de la micoplasmosis en latinoamérica. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO AVICULTURA, 20, 2007, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Centro de Evento Fingers, 2007. p. 111-124.

EWING, B., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FERGUSSON, M.M.; LEITING, V.A.; KLEVEN, S.H. Safety and efficacy of the avirulent *Mycoplasma gallisetpticum* strain K5054 as live vaccine in poultry. *Avian Diseases*, v.48, n. 1, p. 91-99, 2004.

GOH, M.S.; GORTON, T.S.; FORSYTH, M.H. *et al*. Molecular and biochemical analysis of a 105-kDa *Mycoplasma gallisepticu*m cytadhesin (GapA). *Microbiology*, v. 144, n. 11, p. 2971-2978, 1998.

GHARAIBEH, S.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R. *et al*. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan. *Avian Diseases*, v. 55, n. 2, p. 212-216, 2011.

GLISSON, J. R.; KLEVEN, S. H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: further studies on egg transmission and egg production. *Avian Diseases*, v. 29, n. 2, p. 408-415, 1985.

HANATOW, L.L.; KEELER JR, C.L.; TESSMER, L.L. *et al*. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infection and and Immunology*, v. 66, n. 7, p. 3436-3442, 1998.

HARASAWA, R. Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S RNA spacer sequence. *Microbiology and Immunology*, v. 43, n. 2, p. 127-132, 1999.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequencer alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, n. 10, p. 95-98, 1999.

KIMURA, M.A. Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KLEVEN, S. H. Control of avian Mycoplasma infections in comerical poultry. *Avian Diseases*, v. 52, n. 3, p. 367-374, 2008.

KLEVEN, S. H. Transmissibility of the F-strain of *Mycoplasma gallisetpticum* in leghorn chickens. *Avian Diseases*, v. 25, n. 4, p. 1005-1018, 1981.

LIN, M.Y.; KLEVEN, S.H. Evaluation of attenuated strains of *Mycoplasma gallisepticum* as vaccines in young chickens. *Avian Diseases*, v. 28, n. 1, p. 88-99, 1984.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A. M. *et al*. (Eds). *Diseases of Poultry*. 11 ed. Ames: Iowa State University Press. 2003, p. 722-744.

LEY, D.H.; AVAKIAN, A.P.; BEKHOFF, J.E. Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and meat turkeys caused by F strain: identification by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis, and the polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v. 37, n. 3, p. 854-862.1993.

MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. In: AVIAN mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). 5 ed. Paris: OIE Biological Standards Commission. 2004. v. 2, cap. 2.7.3, p. 842-855.

METTIFOGO, E; BUZINHANI, M.; BUIM, M.R. *et al*. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil. *Journal of Veterinary Medicine B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 53, n. 9, p. 445-450, 2006.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. *et al*. (Eds). *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009. p. 485-502.

RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N. *et al*. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases*, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.

RODRIGUEZ, R.; KLEVEN, S.H. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. *Avian Diseases*, v. 24, n. 4, p. 800-807, 1980.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p.5463-5467, 1977.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al*. MEGA5: molecular Evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, n. 10, *p*. 2731-2739, 2011.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of molicutes in molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. In: RAZIN, S; TULLY, J. G., (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995a, v. 1, p. 33-39.

TULLY, J.G. Cloning and filtration tecnhiques for mycoplasmas: mycoplasma. In: RAZIN, S.; TULLY, J.G. (Eds). *Methods in mycoplasmology*. San Diego: Academic Press, 1995b, v. 1, p. 173-177.

VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X. *et al*. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.71, n.5, p. 680-698, 2006.

WOSE, C.R.; STACKEBRANDT, E., LUWIG, W. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Mollecular Evolution*. v. 21, n. 4, p. 305-316, 1985.

ZAIN, Z.M.; BRADBURY, J.M. Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. *Veterinary Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 45-57, 1996.

5.CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização molecular realizada permitiu conhecer algumas estirpes de micoplasmas em aves industriais, através de estudo da filogenética evolutiva, molecular e epidemiológica destes agentes.

Foram descritas estirpes de micoplasmas não detectados previamente em galinhas, frangos de corte e reprodutores da indústria avícola brasileira.

O modelo de estudo de patogenicidade em ovos SPF não contribuiu satisfatoriamente para o entendimento da importância econômica do *Mycoplasma gallinarum* para a avicultura industrial de postura. Acredita-se que estudos histopatológicos e imunohistoquimicos poderiam ajudar a esclarecer o significado da heterogeneidade genética encontrada para este agente.

Embora a imunização com vacina viva seja um método útil e eficaz na redução das perdas econômicas por *Mycoplasma gallisepticum* em poedeiras comerciais, a intensificação da avicultura brasileira sugere a necessidade de adoção de medidas de biosseguridade no uso de vacinas vivas de MG em poedeiras.

A confirmação de estirpes vacinais de MG em reprodutores alerta para o escape de vacina viva de poedeiras para reprodutores e prejuízos ao programa oficial de controle e erradicação de MG, advindos com a prática da vacinação deste sistema de criação.