

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

***Mycoplasma* em fígados de *Amazona aestiva*
procedentes do CETAS-BH**

MARCELA CARVALHO ORTIZ

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2014

Marcela Carvalho Ortiz

**Detecção molecular de *Mycoplasma* em fígado de papagaio verdadeiro
(*Amazona aestiva*) em triagem no CETAS-BH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2014

O77m Ortiz, Marcela Carvalho, 1981-
Mycoplasma em fígado de *Amazona aestiva* procedentes do CETAS-BH / Rodrigo
Mezêncio Godinho. – 2014.

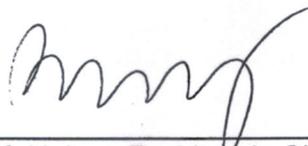
42p. : il.

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

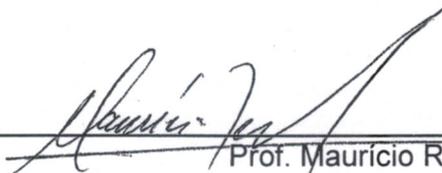
1. Papagaio (Ave) – Doenças – Teses. 2. Micoplasmose em animais – Teses.
3. Animais selvagens em cativeiro – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.686 089 6

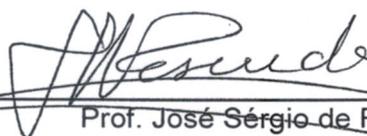
Dissertação defendida e aprovada em 29 de fevereiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente



Prof. Mauricio Resende



Prof. José Sérgio de Resende

*As aves, seres majestosos,
dedico meu mestrado e
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e familiares, pelo apoio, carinho e compreensão pela minha constante ausência nos últimos tempos.

Ao meu orientador, Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins, pela presença constante, pela simplicidade e prazer em ensinar e, acima de tudo, pelo exemplo de perseverança, que me estimulou a superar cada um dos muitos obstáculos enfrentados durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores José Sérgio de Resende e Maurício Resende pelo aconselhamento, momentos de descontração e ensinamentos.

Ao Camilo Alvarenga pela cumplicidade e estímulo.

Aos colegas do laboratório de Doenças das Aves pela agradável convivência, auxílio, confiança, companheirismo, paciência, apoio e momentos de alegria e descontração.

Aos funcionários do laboratório, em especial ao Cláudio pelo auxílio e amizade.

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA que permitiu gentilmente o desenvolvimento de minha pesquisa, em especial aos veterinários Daniel Vilela e Cecília Barreto pela amizade, conselhos e exemplo.

À Secretaria da Pós Graduação, Luzete e Déborah pela eficiência e amizade.

A toda equipe da Clínica Veterinária Vida de Cão, em especial Adriana e Eduardo Campolina pela amizade, incentivo e exemplo de profissionalismo.

Sou grata a todos que incentivaram, participaram e de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por colocar tantos anjos em meu caminho.

MUITO OBRIGADA!

*“Você não sabe
O quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas
Antes de dormir
Eu nem cochilei”*

(A Estrada – Cidade Negra)

SUMÁRIO

	RESUMO.....	11
	ABSTRACT.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1	Psitaciformes.....	13
3.2	Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).....	14
3.3	Micoplasmose.....	15
3.3.1	Etiologia.....	15
3.3.2	Histórico.....	16
3.3.3	Distribuição e Ocorrência.....	17
3.3.4	Patogenicidade e virulência.....	17
3.3.5	Epidemiologia.....	18
3.3.6	A doença.....	18
3.3.7	Diagnóstico.....	19
3.3.7.1	Diagnóstico sorológicos.....	19
3.3.7.2	Isolamento.....	20
3.3.7.3	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	20
3.3.7.4	Prevenção e Controle.....	21
3.3.7.5	Tratamento.....	22
3.3.7.6	Micoplasmas em Aves Selvagens.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Local	24
4.2	Aves.....	25
4.3	Extração do DNA.....	25
4.4	Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA.....	25
4.5	Amplificação do DNA e Eletroforese em Gel de Agarose.....	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÕES.....	32
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese de produtos de PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta.....	26
Figura 2	Papagaio Verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>).....	27
Figura 3	Achados anatomopatológicos de caquexia com atrofia da musculatura peitoral em <i>Amazona aestiva</i>	28
Figura 4	Achados anatomopatológicos em <i>Amazona aestiva</i> . Aerossaculite em sacos aéreos torácicos caudais em papagaio verdadeiro oriundo do CETAS (BH/MG).....	28
Figura 5	Achados anatomopatológicos em <i>Amazona aestiva</i> . Esteatose em papagaio verdadeiro oriundo do CETAS (BH/MG).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C -	Graus Celsius
µL -	Microlitro
Mm -	Micrômetro
µM -	Micromolar
Pmoles -	Picomoles
bp -	Pares de base
Ca ²⁺ -	Íons de Cálcio
CETAS -	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CITES -	Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção
cm -	Centímetro
g/dL -	Gramas por decilitros de volume
DCR -	Doença crônica respiratória
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
dNTP -	Trifosfato deoxyribonucleotídeo
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA -	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA -	Estados Unidos da América
EV -	Escola de Veterinária
Hb -	Concentração de hemoglobina
HI -	Inibição da hemaglutinação
IBAMA -	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IC -	Índice de confiança
ICB -	Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
ICTV -	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IM -	Intramuscular
kDa -	kilodalton
KOH -	Hidróxido de potássio
Mg ²⁺ -	Íons de magnésio
Min -	Minutos
mL -	Millilitro

mm-	Milímetro
mM -	Millimolar
M -	Molar
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG -	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS -	<i>Mycoplasma. synoviae</i>
MM -	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
nm -	Nanômetro
n° -	Número
ORF -	<i>Open reading frame</i>
PAGE -	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS -	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR -	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNSA -	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RT-PCR -	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
rpm -	Rotações por minuto
s -	Segundos
ss-DNA -	DNA fita simples
SAL -	Soroaglutinação lenta
SAR -	Soroaglutinação rápida em placa
TE -	Tris-EDTA
UFMG -	Universidade Federal de Minas Gerais
UV -	Ultravioleta
WBC -	<i>White blood cell</i>
VO -	Via oral

RESUMO

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) está entre os mais importantes patógenos aviários. Em decorrência da gravidade das infecções nas aves industriais, sob a coordenação do Programa Nacional de Sanidade Avícola, estabeleceu-se a obrigatoriedade da erradicação de MG dos plantéis reprodutores, para a conformidade ao mercado internacional. Apesar de este patógeno ser bem estudado nas populações de aves domésticas destinadas à produção de carne e ovos, não se sabe o *status* da infecção em populações de aves da fauna, em particular àquelas que mais sofrem com o tráfico de animais selvagens, como, por exemplo, o papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). Este estudo teve como objetivo avaliar 100 amostras de fígado de papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) para MG por reação da polimerase em cadeia. As aves descritas vieram a óbito no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Belo Horizonte, em Minas Gerais, onde passavam por um processo de triagem após sua apreensão pela fiscalização ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Das 100 amostras avaliadas cinco foram positivas (5/100) para MG, nas quais se destacam como achados de necropsia, caquexia e congestão ou isquemia gastrintestinal e aerossaculite. Destaca-se que, em 80% das amostras positivas para MG, também foi detectada, em trabalho prévio por outros autores, positividade para *Chlamydophila psittaci*, o que poderia significar agravamento e piora no prognóstico de reabilitação das aves em triagem. Considerando-se que amostragens de fígado podem resultar em subdiagnóstico de MG, haveria a possibilidade de os índices reais serem mais altos e, tendo em vista o risco zoonótico de *C. psittaci*, a monitoração regular pode ser recomendada para plantéis, incluindo elaboração de programa sanitário específico.

Palavras-chave: Micoplasmose, *Mycoplasma gallisepticum*, papagaio verdadeiro, *Amazona aestiva*, PCR.

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum (Mg) is amongst the most important avian pathogens. Due to the severity of infections and commercial restrictions in the poultry industry, as coordinated by the National Poultry Health Program, it is obligatory the eradication of Mg from breeding flocks, for the conformity to the international trade. Although Mg is well studied in chickens, its status is unknown in wild bird species, particularly those most affected by trafficking, such as the Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*). Mg occurrence was investigated by PCR in 100 liver samples from *A. aestiva* that died at triage in the Wild Animals Triage Center (CETAS-IBAMA) of Belo Horizonte, Minas Gerais. Five samples were found positive (5 / 100) for Mg DNA, birds which stood out with emaciation, gastrointestinal congestion or ischemia, and air sacculitis. It was interesting to notice that 80% of the positive samples for Mg were also positive for *Chlamydophila psittaci*, as detected in a previous study, which may indicate worsened prognosis for rehabilitation. Considering that liver is not the ideal sampling material for Mg diagnosis, results may indicate subdiagnosis and, if estimates agree with previous findings on Mg, the zoonotic relevance of *C. psittaci*, may recommend for the regular monitoring and the adoption of a specific health programme for psittacines.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Amazona aestiva*, Blue-fronted Amazon parrot, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Aves da ordem Psittaciformes são inteligentes, muito coloridas, zigodáctilas e têm como principal característica morfológica um bico adunco, incluindo 332 espécies e 78 gêneros, representados principalmente pelas araras, papagaios, cacatuas e maritacas. O papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) destaca-se como a espécie mais popular, principalmente pela sua capacidade de imitar a voz humana, tornando ave a mais cobiçada no Brasil para companhia. Por esse motivo, ocorre a captura de filhotes e destruição dos locais onde nidificam, levando ao declínio de suas populações. A atividade humana, com o desmatamento, modificação e ocupação do solo, urbanização, agricultura intensificada, introdução de fauna exótica e a ocorrência de doenças são ameaças comuns à fauna silvestre (Forshaw e Knight 2006; Gwynne et al., 2010; Stastny e Bejcek, 2002).

O conhecimento dos patógenos que acometem aves silvestres é importante para estabelecer medidas preventivas, tratamentos eficazes e para a elaboração de protocolos sanitários para viabilizar a criação e reintrodução de aves selvagens. No Brasil, apesar da grande biodiversidade, pouco se sabe sobre esses microorganismos e o impacto que eles causam nas espécies mantidas em cativeiro.

As micoplasmoses são enfermidades causadas por bactérias do gênero *Mycoplasma*, as menores bactérias conhecidas, amplamente distribuídas entre os seres vivos, podendo causar diversas doenças com caráter agudo ou crônico. A determinação da ocorrência dos micoplasmas nas populações de animais selvagens é um trabalho urgente em função da ameaça de extinção de diversas espécies. A vigilância epidemiológica e a biossegurança de aves selvagens deve ser uma preocupação sanitária constante, pela

possibilidade da perda de espécies importantes para conservação. A detecção do *Mycoplasma* nos animais silvestres é crescente, sendo descrita associada ou não a outras enfermidades em aves, principalmente que acometem o sistema respiratório (Razin e Tully, 1995; Razin et al, 1998).

Para a avicultura comercial, o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é a espécie de maior importância econômica, em função das perdas decorrentes da doença crônica respiratória (DCR) e dos embargos ao comércio internacional para plantéis infectados. Devido a sua importância, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu através da Portaria Ministerial nº 193 de 19 de Setembro de 1994, no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), as normas para controle e erradicação da micoplasmose e outras enfermidades de grande impacto na avicultura. A monitoração dos plantéis de aves selvagens em reprodução deve atender às recomendações do PNSA, para assegurar a adoção das medidas de biossegurança tanto à avicultura industrial quanto à conservação da avifauna (Brasil, 2001).

Os agentes da micoplasmose perpetuam-se na natureza infectando grande variedade de aves domésticas e de vida livre, e disseminam-se na população de aves (Dorrestein, 2010; Lierz et al., 2008b). Embora estas enfermidades sejam amplamente pesquisadas em aves comerciais de corte e postura, alguns possíveis elos da cadeia epidemiológica, dentre os quais se inclui aves, têm sido pouco estudados. Propõe-se estudo de ocorrência de Mg em psitacídeos mantidos no CETAS do estado de Minas Gerais, com a finalidade de verificar a presença, eventual importância e participação em patologia, indicar possível papel das aves na epidemiologia, assim como potencial

impacto na conservação das espécies nativas em triagem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a ocorrência de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) em amostras de fígado de *Amazona aestiva* em óbito no Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS) de Belo Horizonte, Minas Gerais entre 2008 e 2011. Dentro desse contexto, utilizar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e correlacionar os casos positivos com achados de necropsia.

2.2 Objetivos específicos

- Padronização da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção de MG em psitacídeos da espécie *Amazona aestiva* (Papagaio Verdadeiro) em triagem.
- Determinar a presença de infecção por MG em papagaios do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte.
- Correlacionar os achados de necropsia à detecção molecular de MG.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Psittaciformes

As aves da ordem Psittaciformes são distinguidas das outras ordens de aves devido às suas características físicas e filogenéticas. Nesta ordem estão identificadas 332 espécies e 78 gêneros, tendo como principais representantes as araras, papagaios, cacatuas e maritacas (Forshaw e Knight, 2006).

O Brasil é o país mais rico do mundo em espécies na família *Psittacidae* (84 espécies), possuindo desde o menor exemplar (tuim, com 12 cm), até o maior representante (a arara-azul, com 1 m de

comprimento) sendo que 16 espécies de psitacídeos estão vulneráveis ou ameaçadas de extinção. Duas espécies estão em condição pior, a Arara-azul-pequena, desaparecida da natureza nos últimos 50 anos e considerada extinta, e a Ararinha-azul, extinta na natureza. Em Minas Gerais, cinco espécies de ocorrência natural estão ameaçadas de extinção (Brasil, 2003).

Dentre as espécies brasileiras, destaca-se o gênero *Amazona*, que segundo Sick (1997) contém 28 espécies, muitas delas em processo de extinção. Os papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) são incluídos nesse gênero, os quais possuem colorido facial característico e espelho na asa, visível em vôo. Sociáveis, mesmo no bando o casal permanece próximo. Popular como ave de gaiola, *A. aestiva* está em declínio populacional pela captura incessante (Forshaw e Knight, 2006; Gwynne *et al*, 2010).

Os Psittaciformes são as aves mais inteligentes e que possuem o cérebro mais desenvolvido. Tem a capacidade de imitar, com grande fidelidade, diversos sons, inclusive palavras (Forshaw, 2006; Stastny, 2002). Historicamente, os humanos têm demonstrado um interesse especial por essas aves, explorando a sua beleza, inteligência e sociabilidade. De fato, há registros desde a Civilização Egípcia e no Segundo Império Romano da manutenção de papagaios como animais de companhia. No século XV, os marinheiros de Cristóvão Colombo, à chegada ao Continente Americano, depararam-se com papagaios mantidos nas habitações dos indígenas como animais de companhia (Piçarra, 2009).

A utilização destas aves, em exposições de treino e beleza física, tem sido uma atividade constante na história e mantêm-se hoje em dia em zoo parques. A capacidade de aprendizagem, raciocínio lógico e numérico, produção de linguagem vocal e

criatividade de algumas espécies, é alvo de diversos estudos e publicações. Em muitos aspectos, as capacidades intelectuais destes animais chegam a ser comparáveis às dos cetáceos, grandes símios e do próprio ser humano. Piçarra (2009), compilou algumas capacidades de lógica no papagaio cinzento africano (*Psittacus erithacus erithacus*), e foi autora de dezenas de outros estudos sobre o desempenho intelectual de aves desta espécie

Aves psitaciformes são longevas, com as espécies maiores podendo viver mais de 50 anos. Formam um grupo de aves distintas das demais, tendo uma série de características específicas. São muito coloridos e tem como principal característica morfológica um bico adunco, frequentemente de grandes dimensões; que possui uma região denominada cera, onde se abrem as narinas (Forshaw e Knight, 2006; Stastny, 2002). A mandíbula superior é consideravelmente maior que a inferior e não está completamente fixa ao crânio, como acontece com outras aves, está ligada a este por um tipo especial de articulação, que lhe permite movimentá-la para cima e para baixo. A mandíbula inferior pode ser movida lateralmente, diferente de outras aves, o que torna o bico, juntamente com língua, um versátil, assim como delicado, membro de apreensão. A mandíbula superior lhes permite agarrar os alimentos com firmeza, assegurando fácil quebra de casca e a língua carnuda possui papilas gustativas (Stastny, 2002).

Dentro desse contexto, outra característica própria dos psitacídeos é o posicionamento dos dedos do pé em disposição zigodáctila, oponentes dois a dois, dois orientados cranialmente e dois orientados caudalmente, usados para segurar ramos e levar alimentos ao bico. Dedos dos pés em disposição zigodáctila ocorrem também em outras aves arbóreas, como pica-paus, cucos e papa-léguas, e algumas corujas (Forshaw e Knight, 2006; Stastny, 2002).

Os Psittaciformes nidificam geralmente em cavidades, sendo que apenas algumas espécies constroem grandes ninhos esféricos em árvores e, põem ovos brancos. Os filhotes são nidícolas, nascem sem penas e cegos, sendo alimentadas pelos pais no ninho durante um longo período. A dieta é, principalmente de origem vegetal, embora também capturem insetos, especialmente durante a alimentação das crias. A maioria das espécies é muito sociável e vive em bandos ao longo de todo o ano, ou pelo menos, após a reprodução (Stastny, 2002).

3.2 Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*)

O Papagaio verdadeiro possui em média comprimento de 38 cm de comprimento e pesa cerca de 400 gramas. A espécie pode ser comum em mata de galeria, cerradão e áreas abertas próximas, inclusive em áreas de pastos e ocorre, no Brasil, na região Nordeste (Piauí, Pernambuco e Bahia), Centro-oeste e sudeste (Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso), e Sul (até o Rio Grande do Sul), mas está ausente nas áreas litorâneas. Nos países vizinhos, ocorre na Bolívia, Paraguai e Argentina (Gwynne et al, 2010; Sick, 1997).

No que se refere às suas características fenotípicas de plumagem é observado a cor verde predominante, face amarela, que pode incluir a garganta, fronte ou testa azul, pescoço, costas e peito com leve escamado mais escuro. Em vôo, espelho vermelho bem visível na asa e ombro amarelo (Bolívia) ou vermelho (Brasil). A cabeça pode ser verde no jovem e quase toda amarela na ave velha. O bico é negro no adulto. (Alderton, 2003; Gwynne et al, 2010; Sick, 1997).

Habita a copa de florestas úmidas ou secas, palmeirais e beiras de rio. Vive em casais ou bandos pequenos, que fora da época de cria podem se juntar em grupos numerosos. Recebe diversos nomes populares de acordo

com a região do Brasil. Exemplos conhecidos são papagaio-de-frente-azul, curau, papagaio-grego, papagaio-comum, ajuru-etê, papagaio-curau, trombeteiro (Mato Grosso) e louro. (Sick, 1997; Gwynne et al, 2010).

No que se referem à clínica veterinária, muitas espécies silvestres são criadas como animais domésticos, resultando em mudança de demanda no atendimento, com um crescente número de pacientes “novos pets”. Cabe ressaltar que destas consultas especializadas, destaca-se o papagaio verdadeiro (Sick, 1997; Piçarra, 2009).

Desse modo, a fama de falador do papagaio verdadeiro o torna uma ave cobiçada no Brasil, a despeito da legislação de fauna vigente, que desde 1967 (lei nº 5.197 de 3 de janeiro de 1967) proíbe a sua captura para comércio. Em contrapartida, papagaio sempre foi uma presença comum nos lares do Brasil, especialmente nas cidades do interior, como animais de companhia (Sick, 1997; Piçarra, 2009; Gwynne et al, 2010).

Como reflexos disso, as populações de papagaio verdadeiro estão em declínio. Essa é uma das consequências da captura de filhotes para tráfico ilegal. Durante a captura, são perdidos imediatamente os ovos não eclodidos. Muitos filhotes morrem no ato da retirada das aves dos ninhos e com frequência a árvore é derrubada, eliminando-se os locais de nidificação para reprodução, como palmeiras velhas, que são os melhores locais para procriação (Sick, 1997; Piçarra, 2009; Gwynne et al, 2010).

As atividades humanas são outros fatores que ameaçam de forma importante as populações, principalmente o desmatamento, o uso do solo para agricultura ou urbanização, a introdução de fauna exótica e a ocorrência de doenças. Atualmente a espécie *Amazona aestiva* está classificada no anexo II do CITES (Convenção Internacional para o Tratado

contra o Tráfico de Animais Silvestres), não sendo, portanto, considerada criticamente ameaçada (Sick, 1997; Piçarra, 2009; Gwynne et al, 2010).

3.3 Micoplasmose

3.3.1 Etiologia

Em relação as micoplasmoses, são enfermidades causadas pelas menores bactérias conhecidas, do gênero *Mycoplasma*, aproximando-se em tamanho aos grandes vírus (300nm). Esses microorganismos têm predileção pelas membranas mucosas e serosas das aves, onde provocam problemas respiratórios, articulares e urogenitais. Em aves, as formas clínicas clássicas são a doença crônica respiratória (DRC) das galinhas, a sinusite infecciosa dos perus e aerossaculite das aves (Kleven, 2003; Nascimento, 2009). Há espécies que causam doenças em plantas, humanos e outros animais. Bactérias do gênero *Mycoplasma* foram consideradas por muito tempo parasitas exclusivos do ambiente extracelular, admitindo-se a existência de espécies de replicação intracelular e outras que o fazem facultativamente (Razin e Tully, 1995; Razin et al, 1998).

No que diz respeito ao gênero *Mycoplasma*, ele possui mais de cem espécies descritas e tende a ser espécie específico, porém, alguns infectam apenas uma única espécie de animais e outros podem infectar várias espécies diferentes (Kleven, 2003). Na ordem Mycoplasmatales, a família Mycoplasmatacae, integra os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* e na ordem Acholeplasmatales, encontra-se a família Acholeplasmatacae, com o gênero *Acholeplasma* (Yamamoto, 1990). Os micoplasmas são classificados na família Mycoplasmatacae devido ao requerimento de colesterol para seu crescimento, ao tamanho do genoma (entre 600 e 1.350 pares de base) e por terem como

hospedeiros animais. Ainda, a divisão em gêneros é feita de acordo com seus mecanismos para obtenção de energia (Whitford *et al.*, 1994).

Micoplasma é a denominação geral para os microorganismos da divisão Teneccutes e da classe *Mollicutes* (do latim *Mollis* = macio, *cutis* = pele), caracterizados pela ausência de parede celular (Kleven, 2003). Devido a essa característica, os micoplasmas são naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana, como os antibióticos do grupo das penicilinas (beta-lactâmicos). A membrana celular confere a possibilidade de variações de forma, embora a esférica seja a forma predominante (Razin e Tully, 1995; Razin *et al.*, 1998). No que se refere ao seu formato podem ser cocóides, cocobacilares ou pleomórficos, medindo de 0.2 a 0.5 µm. Quanto às propriedades tintoriais, são bactérias Gram negativas, porém, são corados por Giemsa ou outros corantes similares. Normalmente se apresentam imóveis e aeróbios facultativos com suas colônias muito pequenas, medindo 1 mm de diâmetro, que sob condições de cultivo adequadas, têm aparência de “ovo frito” (Holt *et al.*, 1994).

3.3.2 Histórico

No que diz respeito às bactérias do gênero *Mycoplasma*, foram cultivadas pela primeira vez no ano de 1898, em conferência ao agente etiológico da pleuropneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB) (Davis *et al.*, 1973).

Nesse sentido, acredita-se que a micoplasmose aviária foi primeiramente descrita em perus por Dodd, na Inglaterra, em 1905, sob a denominação de pneumoenterite epizootica, embora tenha se tornado mais conhecida em 1938, com a descrição da sinusite infecciosa dos perus, por Dickinson e Hinshaw. Ainda em 1952, Markham e Wong associaram o agente

causador da doença crônica respiratória (DCR) à sinusite infecciosa dos perus, posteriormente denominado *Mycoplasma gallisepticum* (MG).

Cabe ressaltar que somente em 1970 foi descrita a forma respiratória, em *Mycoplasma synoviae* (MS), o qual pode ou não estar associado ao MG ou a outros agentes, como *Escherichia coli* ou o vírus da doença de Newcastle e a bronquite infecciosa, inclusive os vacinais, complicando os quadros clínico e patológico (Rosales, 1991; Kleven 2003).

Outro aspecto importante é que, no Brasil, a primeira ocorrência publicada de DCR foi descrita em São Paulo (Garust e Nobrega, 1956). Ainda nesse estado, a DCR chegou a alcançar o quinto lugar entre as doenças diagnosticadas no Instituto Biológico (Bueno *et al.*, 1971).

Em relação ao estado de Minas Gerais, nos anos de 1967 e 1968, obteve-se, por sorologia, as prevalências respectivas de 25,7% e 32,8% para MG (Resende *et al.*, 1969). Ainda, em Minas Gerais, em outro estudo de prevalência com levantamento sorológico para MG, em 2.223 galinhas de 57 municípios, foi constatada 33,4% de positivos (Oliveira, 1973).

Além disso, em psitacídeos no centro de triagem, examinados por PCR de swabs cloacais, da fenda palatina ou de traquéias, no CETAS-BH, foram encontradas ocorrência variável de aproximadamente 50-60% em *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Ara ararauna*, *Aratinga jandaya* e *Pionus fuscus*, de 80% em *Ara ararauna* e não houve ocorrência em *Guarouba guarouba* e *Anodorhynchus hyacinthinus* (Gomes *et al.*, 2010).

O diagnóstico de infecção por MG e MS pelo uso da reação em cadeia da polimerase, PCR, teve a participação pioneira de pesquisadores brasileiros

(Nascimento e Yamamoto, 1991; Nascimento *et al.*, 1993; Silveira *et al.*, 1996).

No estado do Rio de Janeiro, entre as doenças diagnosticadas nos anos 1980 a 1985, conforme arquivos do Setor de Ornitopatologia da EMBRAPA, as micoplasmoses ocuparam o primeiro lugar entre as enfermidades diagnosticadas (Nascimento *et al.*, 1982).

3.3.3 Distribuição e Ocorrência

As micoplasmoses aviárias têm distribuição mundial (Yoder Jr., 1991; Kleven *et al.*, 2003a). As galinhas e perus são reservatórios naturais de MG e MS, os quais ficam mantidos nas membranas mucosas do trato respiratório superior e, com menor frequência, genital das aves portadoras (Nascimento, 2009).

Há várias estirpes de Mg, diferenciadas fenotípica e genotipicamente (Khan *et al.*, 1987; Kleven, *et al.*, 1990; Nascimento *et al.*, 1991), com graus diferentes de patogenicidade e virulência, podendo também diferir quanto a imunogenicidade (Kleven *et al.*, 1991, 2003; Yamamoto, 1990; Chin *et al.*, 1993).

3.3.4 Patogenicidade e virulência

No que se refere aos micoplasmas, assim como todas as bactérias, eles não apresentam membrana nuclear. A membrana plasmática é tríplice e composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e fosfolipídeos, que constituem os determinantes antigênicos mais importantes, capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro, bem como de funcionar como fatores tóxicos e mitogênicos (Yamamoto, 1990; Razin *et al.*, 1998).

Nesse sentido, para que ocorra a infecção, os micoplasmas devem ser capazes de se

fixar às membranas mucosas, principalmente do trato respiratório, digestório e urogenital e ainda, evitar o sistema imunológico do hospedeiro (Whitford *et al.*, 1994). O *Mycoplasma gallisepticum*, e outros micoplasmas, apresentam na membrana citoplasmática, visualizáveis ao microscópio eletrônico, estruturas terminais especializadas e projeções fimbriares, com funções de motilidade e aderência às células do hospedeiro.

Dentro desse contexto, algumas estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* secretam toxinas neurotrópicas e letais para galinhas e perus (Kleven, 2003; Nascimento e Pereira, 2009). Hemolisinas, fatores ciliostáticos, proteases, e nucleases, ao interagirem com as células hospedeiras, podem levar à morte celular ou induzir a uma infecção crônica. O poder mitogênico dos micoplasmas sobre os linfócitos B e T pode ser responsável pela infiltração linfocitária que ocorre após estabelecimento da infecção do sistema respiratório, dos tecidos articulares, dos sistemas uro-genital ou do digestivo (Whitford *et al.*, 1993).

Cabe ressaltar que doenças autoimunes podem ser causadas pelo *Mycoplasma gallisepticum*, com a síntese de anticorpos e células imunes direcionadas contra antígenos comuns ao micoplasma e ao hospedeiro, presentes principalmente em eritrócitos, ou por deposição de complexos imunológicos (Nascimento, 2009).

Outro aspecto relevante dos micoplasmas está na sua capacidade em manter uma infecção latente e aguardar a debilitação do hospedeiro, com o deslocamento do sítio tecidual de permanência (*habitat*), após o desafio por vírus ou bactérias, para iniciar um quadro mórbido (Whitford *et al.*, 1994; Chin *et al.*, 1993; Kleven, 2003a). Os micoplasmas são suscetíveis a mutações as quais geram modificações nos antígenos de superfície e facilitam seu escape do sistema

imunológico do hospedeiro, facilitando assim sua sobrevivência, quando aderido à mucosa do trato respiratório das aves, conforme comprovado para *Mycoplasma gallisepticum* (Markhan *et al*, 1996; Woese *et al*, 1985).

3.3.5 Epidemiologia

Em relação à transmissão do micoplasma, ela ocorre entre indivíduos de uma espécie hospedeira ou de espécies estreitamente relacionadas, e em raras exceções, podem ser acometidas por espécies de micoplasmas hospedeiro-específicas (Yoder Jr., 1991a; Kleven, 2003a). Essas bactérias são transmitidas horizontalmente por aerossóis, venereamente durante o acasalamento ou inseminação artificial. Ainda, por contágio direto com outras aves ou indireto por pessoas, animais, ração, água, fômites. Também pode ocorrer a transmissão vertical pelo ovo, o qual se infecta ao tocar os sacos aéreos abdominais, que são lesados após a ovulação para o oviduto antes de atingir o infundíbulo, podendo haver a contaminação do oviduto pelo ovo infectado, facilitando assim a infecção de futuros ovos (Nascimento e Pereira, 2009).

3.3.6 A Doença

No que se refere às micoplamoses, são doenças de grande relevância para as aves por resultarem em perdas econômicas por diminuição da produtividade, aumento da mortalidade e embargos comerciais, sendo as principais causadas pelos *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (MM). O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é reconhecido como indiscutível patógeno de preocupação para indústria avícola, podendo causar doenças clínicas ou subclínicas em galinhas, perus e outras aves (Yoder Jr., 1991; Nascimento, 1982; Kleven, 2003).

Em relação a sua apresentação, embora possa ocorrer na forma aguda, as formas crônicas são mais comuns, inclusive a infecção inaparente, que somente é diagnosticada por testes laboratoriais (Nascimento e Pereira, 2009).

Os sinais clínicos e lesões macroscópicas das micoplamoses aviárias estão principalmente confinados ao sistema respiratório, com tosse, espirros, estertores, secreção ocular e nasal e inchaço dos seios infraorbitais.

Em plantéis infectados é comum à diminuição do consumo de alimento, o aumento do índice de conversão alimentar e a queda na produção de ovos. Também ocorre o aumento da mortalidade, a diminuição da eclodibilidade de ovos, mortalidade embrionária, salpingite e infertilidade (Nascimento e Pereira, 2009; Nascimento *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2009).

A doença crônica respiratória (DCR) resulta da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* no trato respiratório superior, principalmente seios paranasais, laringe e traquéia, das galinhas e outras aves. Elas também podem apresentar edema facial e acumulação de muco na laringe e traquéia, resultando em estertor respiratório. Em infecções profundas, os sacos aéreos são também atingidos, e apresentam depósitos de fibrina, comumente com o envolvimento de outros agentes, especialmente *Escherichia coli* (Yoder Jr., 1991a; Kleven, 2003a; Ley, 2003; Ortiz *et al.*, 2009).

Na DCR em aves silvestres, inclusive psitacídeos, pode ocorrer alteração da vocalização, emaciação, dificuldade respiratória, eliminação de muco espesso pelo bico, corrimento nasal, aerossaculite, pálpebras edemaciadas cobertas de crostas. Nesses casos, os sinais clínicos, podem ser semelhantes aos surtos de micoplasmose descritos na avicultura industrial (Cubas, 2007; Ortiz *et al.*, 2009).

É interessante ressaltar também, sobre aves silvestres, a descrição do caso clínico de Ortiz *et al.* (2009) em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). Nesse caso, foi feito atendimento clínico da ave com resultado de PCR positivo para *M. Gallisepticum* em exame laboratorial. Como sinais clínicos foram citados rouquidão, diminuição da vocalização, espirros, inapetência, apatia, e a ave tem histórico de contato direto com galinhas de subsistência e outras aves de vida livre. A fazer a auscultação pulmonar ouviram-se sons estertores respiratórios, aumento da frequência respiratória e ainda, a ave apresentava a plumagem arrepiada. Após realização da radiografia torácica dorso-ventral e obteve-se imagem de áreas radiopacas difusas compatíveis com aerossaculite.

Com relação às alterações anatomopatológicas por *Mycoplasma gallisepticum*, em exame macroscópico, nos casos de doença respiratória, são encontradas inflamações catarrais nas fossas e seios nasais, faringe, traquéia e brônquios. Os sacos aéreos apresentam-se espessados, opacos e podem conter depósitos de fibrina, e ainda, pericardite com aderência, quando há complicação com infecções secundárias. Pneumonias e lesões do oviduto (salpingite) também podem ser observadas.

No que diz respeito ao exame microscópico, realizado por histopatologia, é possível observar infiltrações difusas ou nodulares de células mononucleadas na traquéia e sacos aéreos, hiperplasia das glândulas mucosas e infiltrações linfóides. No pulmão, são encontradas áreas de pneumonia intersticial, alterações linfocitárias e, em menor frequência, granulomas. Devido ao processo respiratório das aves, em que o ar inspirado passa diretamente para os sacos aéreos por grandes brônquios, para então depois liberá-lo aos pulmões, os sacos aéreos são os

órgãos mais afetados (Yoder Jr., 1991; Chin *et al.*, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a).

3.3.7 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da infecção por micoplasmas pode ser epidemiológico, pela análise dos dados sorológicos associados ao histórico de morbidade, mortalidade e parâmetros de produção, coletados durante a investigação de um surto ou em um monitoramento. Porém também pode ser clínico, pela observação dos sinais clínicos, lesões anatomopatológicas, isolamento e tipificação sorológica com anti-soro para cada espécie de micoplasma por métodos de imunofluorescência e, ainda, imunohistoquímica e técnicas moleculares, como PCR (Charlton *et al.*, 1996). Mesmo na presença de um quadro clínico compatível, o diagnóstico laboratorial é fundamental para confirmação da suspeita.

Os programas de controle e erradicação de micoplasmoses têm sido adotados no Brasil e exterior, baseados na detecção de anticorpos pelos testes de triagem sorológica, confirmados pela detecção do genoma ou isolamento e identificação em bacteriologia confirmatória (Feberwee *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2005; Brasil, 2001). A confirmação do diagnóstico laboratorial pelo isolamento em rotina torna-se difícil pela demora de uma a três semanas para o cultivo e a caracterização do agente (Nascimento, 1994).

3.3.7.1 Diagnóstico Sorológico

No que diz respeito à sorologia, é um método laboratorial que visa o estudo e a mensuração do nível de anticorpos no soro das aves expostas a determinado antígeno (Santos e Silva, 2000)

Os testes sorológicos recomendados no PNSA para monitoramento de plantéis são a soroaglutinação rápida em placa (SAR), como triagem, sendo os soros reagentes

retestados por sorroaglutinação lenta (SAL), inibição da hemaglutinação (HI) e/ou ELISA, por apresentarem baixo custo e facilidade de execução (Brasil, 2001; Nascimento *et al.*, 2006). No entanto, reações cruzadas entre espécies de *Mycoplasma* e reações inespecíficas com outras bactérias, causam falhas no diagnóstico, discrepância entre testes e a subsequente necessidade de confirmação por PCR e/ou isolamento (Nascimento *et al.*, 2006, Stipkovits e Kempft, 1996).

Conforme preconizado por SAR (Brasil, 2001; Stipkovits e Kempft, 1996), com reatividade sorológica na diluição igual ou superior a 1:10, o resultado será considerado positivo, enquanto na diluição de 1:5, deverá ser considerado suspeito e, se a reação somente ocorrer em soro não diluído, o resultado deve ser considerado negativo. Entretanto, tem-se verificado, na prática, que não há confiabilidade nos resultados negativos à SAR e que qualquer aglutinação, mesmo em soro não diluído, deve ser considerada como resultado suspeito (Nascimento e Pereira, 2009).

O teste de inibição de hemaglutinação (HI) fundamenta-se na capacidade de alguns microorganismos apresentarem, em sua superfície, estruturas capazes de se combinar com receptores específicos presentes nas hemácias. Tais estruturas são denominadas hemaglutininas. É um teste qualitativo e quantitativo, que mede, principalmente, imunoglobulinas da classe IgG, que aparecem 7 a 10 dias após o início da infecção e persistem por até aproximadamente 6 meses. O teste de HI é considerado positivo quando o título sorológico for igual ou superior a 1:40, suspeito se o título ocorrer entre 1:20 e 1:40 e negativo se for inferior a 1:20 (Kleven, 2003^a; Santos e Silva, 2000).

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é um teste de marcação primária que

serve para detectar e quantificar anticorpos ou antígenos. Uma superfície, como de placas de PVC ou poliestireno, é usada como suporte inerte para adsorção de moléculas antigênicas sobre o qual se adiciona o soro a ser testado. Sobre o complexo formado, adiciona-se antiglobulina conjugada à enzima e esse conjugado se liga ao complexo antígeno-anticorpo (Santos e Silva, 2000).

No Brasil, de acordo com o Plano de Sanidade Avícola (PNSA), através da Instrução Normativa n° 44, de Agosto de 2001, do MAPA (BRASIL, 2001) para avaliação periódica, em estabelecimento avícolas de reprodução, a utilização da Sorroaglutinação Rápida (SAR). Os soros reagentes são retestados por Inibição da Hemaglutinação (HI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzyme linked immuno sorbent assay*). As aves reagentes por sorologia devem ser submetidas ao diagnóstico definitivo por cultivo ou PCR.

3.3.7.2 Isolamento

Para realizar o isolamento, são coletadas as seguintes amostras clínicas, sacos aéreos e traquéias, exsudato sinovial e ocular, suabes da traquéia, sacos aéreos, líquido sinovial e exudato dos seios nasais. Suabes da traquéia ou da fenda palatina, imersos em aproximadamente 1,5 ml de meio de Frey líquido (Frey *et al.*, 1968) modificado, constituem excelentes espécimes, principalmente quando usados para cultivo e/ou detecção molecular por PCR (Razin e Tully 1983, Kleven *et al.*, 1991; Whitford *et al.*, 1994; Stipkovits e Kempft, 1996).

3.3.7.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) é uma das mais importantes ferramentas de diagnóstico desenvolvida nos últimos 20

anos para identificar e caracterizar diversos tipos de patógenos (Olsen e Speer, 2009).

A PCR é um método de amplificação do DNA (ácido desoxirribonucleico), na qual são feitas reações de cópia em série, com a duplicação das concentrações da sequência desejada em cada reação, em média de 35 vezes. Esta reação tem a vantagem de pesquisar diretamente a presença dos micoplasmas nos plantéis avícolas, pela amplificação e detecção parcial do seu genoma, sendo um teste que pode ser utilizado para a confirmação dos resultados sorológicos (Brasil, 2001).

Farmer e colaboradores (2005) ao avaliarem periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) inoculados experimentalmente com isolados de *M. gallisepticum* de frangos (*Gallus gallus domesticus*), de papagaios-da-testa-amarela (*Amazona auropalliata*) ou de tentilhões (*Carpodacus mexicanus*), demonstraram a detecção do agente pela PCR por três semanas (excreção fecal) e baixa correlação com os sinais clínicos para os três antígenos isolados.

Psitacídeos que vieram a óbito em triagem foram examinados por PCR no CETAS-BH, apresentando ocorrência variável de 50 a 60% (*Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Ara ararauna*, *Aratinga jandaya* e *Pionus fuscus*), de 80% (*Ara ararauna*) e não detecção (*Guarouba guarouba* e *Anodorhynchus hyacinthinus*) (Gomes *et al.*, 2010). O diagnóstico de infecção por Mg e Ms por PCR, teve a participação pioneira de pesquisadores brasileiros (Nascimento e Yamoto, 1991; Nascimento *et al.*, 1993; Nascimento e Yamamoto, 1994; Silveira *et al.*, 1996).

3.3.7.4 Prevenção e Controle

Os prejuízos decorrentes da convivência com as infecções por micoplasmas provocaram a adoção de estratégias de

controle na avicultura comercial. Assim, foram criadas normas do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), as quais definem as medidas de monitoramento de micoplasmoses em estabelecimentos avícolas de controle permanente ou dos eventuais integrantes do comércio internacional de aves destinadas à reprodução e produção de ovos férteis. Para a conformidade ao comércio internacional, e adequação ao PNSA, o estabelecimento avícola deverá estar certificado como livre de MG, MS e MM; conforme estabelecido nas normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (Brasil, 2001).

Dentre as estratégias adotadas, é realizada a desinfecção ambiental, pois os micoplasmas são sensíveis à maioria dos desinfetantes (amônia quaternária, compostos iodados, fenólicos, álcool). As condições físicas (exposição ao sol) e químicas (pH) ambientais são geralmente capazes de inativação de micoplasmas. Por esta razão, após limpeza e desinfecção, um adequado vazios sanitário e distanciamento entre unidades produtoras são considerados eficientes. As aves vivas portadoras são consideradas como principal risco sanitário. As terapias incluem os antimicrobianos que interferem na síntese protéica, dos ácidos nucleicos e no metabolismo dos lipídios (Kleven, 2003a). Na avicultura de produção as medidas de biossegurança preconizadas podem ser associadas à antibioticoterapia e programas de vacinação (Tanner *et al.*, 1993; Ortiz *et al.*, 1995; Kleven, 2003a).

Atualmente, há vacinas comerciais contra *Mycoplasma gallisepticum* inativadas e vivas. As vacinas inativadas são recomendadas em determinadas situações de risco, por não ser infecciosas para aves não vacinadas, não dificultarem o diagnóstico micoplasmológico e nunca apresentarem problema de reversão de patogenicidade. As vacinas vivas,

entretanto, promovem infecção e podem prejudicar o diagnóstico e, principalmente, o monitoramento epidemiológico (Carpenter *et al.*, 1981; Yoder Jr., 1991; Villa, 1998; Ley, 2003). No Brasil não há relato de uso de vacina contra *Mycoplasma gallisepticum* na proteção de aves silvestres.

3.3.7.5 Tratamento

Na avicultura industrial, o tratamento de aves reprodutoras, através da administração de antimicrobianos, não erradica os micoplasmas do plantel, apesar de diminuir a severidade da manifestação clínica e, conseqüentemente, a taxa de transmissão transovariana a um nível que pode ser inferior a 0,1% (Ortiz *et al.*, 1995). Entretanto, a legislação sanitária brasileira (Brasil, 2001) proíbe o tratamento de reprodutores, que devem ser livres das três espécies principais de micoplasmas (MG, MS e MM).

Mashima *et al.* (1997) realizaram um estudo relacionado ao tratamento de conjuntivite associada a *Mycoplasma gallisepticum* em tentilhões e observaram melhora das aves com a administração de tilosina por 21 dias, na dose de 1mg/mL, como única fonte de água de bebida, em associação com solução oftalmológica tópica de cloridrato de ciprofloxacina por aproximadamente sete dias.

Nye (2003) descreveu bons resultados com tilosina, embora recomende drenagem das secreções dos seios paranasais e infusão de Nolvasan (chlorhexidine, Fort Dodge) diluído, e administração oral de tilosina (Tylan® mais vitaminas Elanco®) 0,5g de pó em 0,95 litro de água, por 10 dias. O autor também aconselha em casos de infecções crônicas ou resistentes complicadas, acrescentar antibióticos ao tratamento sistêmico, com base em resultados de isolamento da bactéria oportunista e antibiograma. Ortiz e colaboradores (2009) descrevem o tratamento de um papagaio

verdadeiro usando oxitetraciclina (Avitrin antibiótico®/ 50 mg/Kg, 12/12h VO) durante 26 dias obtendo, com isso, a aparente recuperação da ave.

A terapia com antimicrobianos, principalmente com aqueles que se acumulam em altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório, como tiamulin e enrofloxacin, entretanto, afeta o diagnóstico etiológico da micoplasmose aviária, por impedir o isolamento bacteriológico por swabe das vias aéreas superiores e inibir ou reduzir a resposta imune, chegando, em muitos casos, à negatividade no isolamento e detecção de anticorpos, tanto em frangos de corte quanto em aves de postura. Há, porém, reversão desse quadro com a suspensão do tratamento (Kempf, 1991; Kempf *at al.*, 1992; Tanner *et al.*, 1993; Stipkovits e Burch,1994).

3.3.7.6 Micoplasmas em Aves Selvagens

A detecção de micoplasmas em aves silvestres já é relatada desde a década de 50, quando foi reportado o isolamento de *Mycoplasma* spp. coletado do saco aéreo de um periquito acometido por doença respiratória (Adler, 1957). Desde então, devido ao grande impacto dessa doença para a avicultura comercial, as aves silvestres foram apontadas como possíveis reservatórios e fonte de infecção. Os estudos relativos à doença para aves comerciais, principalmente em galinhas e perus, são extensos, sendo para aves silvestres, no entanto, a preocupação recente (Dorrestein, 2010; Lierz *et al.*, 2008b).

A frequência de doenças respiratórias na clínica aviária é muito alta, o que denota a importância do estudo de *Mycoplasma* como um dos possíveis agentes etiológicos destes quadros (Gerlach, 1994). Considerando os recentes avanços da clínica de aves criadas como *pet*, estudos

relativos a micoplasmose nesses animais também se tornaram necessários (Dorrestein, 2010).

Uma grande variação (0-87%) de prevalência de anticorpos contra Mg, Mm e Ms foi descrita em populações de perus selvagens de 6 estados dos EUA (Fritz *et al.*, 1992). No Arkansas (EUA), em 44 amostras de soros de perus selvagens (*Meleagris gallopavo silvestris*) não foram detectados anticorpos contra Mg e Ms (Hopkins *et al.*, 1990). Perus selvagens capturados na Califórnia, Estados Unidos da América (EUA), apresentaram baixa prevalência de anticorpos no teste de SAR para Mg (8-10%) e média para Mm (33%) (Charlton, 2000).

Bazeman *et al.* (1982) observaram mortalidade de 20% de um bando de papagaios verdadeiros, aparentemente causada por lesões de micoplasmas associadas a outras bactérias. Das aves acometidas, os pesquisadores isolaram *M. gallisepticum* e *M. iowae*. Um grupo de periquitos australianos e outro de frangas da raça Leghorn foram submetidos à infecção experimental com estirpes isoladas de papagaios. No grupo de periquitos australianos, todos os animais apresentaram aerossaculite e sorologia positiva para micoplasmose. Já as frangas não apresentaram nenhuma lesão de saco aéreo, embora com sorologia positiva. Com o estudo, os autores levantaram a hipótese de que diferentes estirpes de *M. gallisepticum* poderiam causar lesões mais graves em determinadas espécies.

Além da importância econômica em aves domésticas e na clínica de aves de companhia, esta enfermidade também vem mostrando grande importância ecológica. Nos anos de 1994 e 1995, nos EUA, foi descrita uma epizootia de conjuntivite em tentilhões que foi associada à infecção por *M. gallisepticum* que se espalhou do leste (Ficher e Converse, 1995; Dhondt, *et al.*,

1998; Ley *et al.*, 2006), a região oeste do país (Duckworth *et al.*, 2003). Acredita-se que no surto documentado, cerca de dez milhões de tentilhões tenham morrido (Nolan *et al.*, 1998). Há evidências de que o *M. gallisepticum* se tornou endêmico na população de tentilhões da região leste, embora a prevalência da enfermidade (clínica) tenha diminuído, sugerindo que houve uma adaptação da bactéria em relação ao hospedeiro (Ley *et al.*, 2006). Após a detecção de *Mycoplasma gallisepticum* nos tentilhões foi sugerido que as agregações de aves em comedouros coletivos foram as condições que favoreceram a epidemia por Mg pois as aves doentes ou infectadas subclínicas poderiam depositar secreções contaminadas nos comedouros compartilhados (Hartup *et al.*, 2004).

Na Geórgia, EUA, 1058 pássaros foram capturados nas proximidades de granjas de galinhas de produção e em locais de alimentação de pássaros. As aves foram testadas pela técnica de SAR para *Mycoplasma gallisepticum* e as reagentes por SAR foram submetidas para a confirmação por PCR. Na técnica de SAR, 19.1% de 671 pássaros capturados nas proximidades das granjas, e 11.6% de 387 pássaros capturados em locais de alimentação foram reagentes para Mg. Entretanto, apenas três tentilhões capturados nas proximidades das granjas foram positivos para Mg pela técnica de PCR (Luttrell *et al.*, 2001).

No Brasil, Horta *et al.* (2008) pesquisaram psitacídeos oriundos do Centro de Triagem de Belo Horizonte com o uso da PCR para a detecção de *M. gallisepticum*, no qual o patógeno foi diagnosticado em 59,2% (29/49) das amostras de swabe cloacal coletados em papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) os quais apresentavam sinais clínicos de doença crônica caquetizante, como apatia, emagrecimento progressivo e perda de apetite. No mesmo

local, Gomes *et al.* (2010) obtiveram entre 50% e 80% de positividade para Mg (PCR) de psitacídeos examinados. A alta frequência demonstrada neste estudo reforça a importância do estudo deste agente em diferentes espécies aviárias, visto a importância clínica e econômica da enfermidade. Ainda em Belo Horizonte, Ortiz *et al.* (2009) também detectou pela técnica de PCR *M. gallisepticum* em um papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) atendido em clínica veterinária com quadro clínico compatível de DCR.

No Rio de Janeiro, Abreu *et al.* (2008) pesquisaram *Mycoplasma gallisepticum* em codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) onde avaliaram 120 soros pela SAR, sendo todos negativos, assim como o PCR. Somente pela IH 28,3% dos soros tinham anticorpos contra MG com títulos de 1:160 em aves consideradas positivas.

Em São Paulo, Duarte *et al.* (2006) pesquisaram micoplasma em 24 amostras de swabe traqueal ou cavidade oral de passeriformes de forma aleatória, das quais 29% (7/24) foram positivas para *Mycoplasma* spp pelo PCR. As aves estudadas não apresentavam sinais clínicos de micoplasmose.

Em trabalho conduzido por Ruder *et al.* (2009) foi identificada a espécie *Mycoplasma corogypsi* como agente responsável por poliartrite em urubus (*Coragyps atratus*). Outros mycoplasmas também foram isolados de rapinantes, como *M. gallisepticum*, *M. glycyphilum*, *Mycoplasma falconis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma buteonis* e *M. vulturi* (Bolske e Morner, 1982; Poveda *et al.*, 1990, 1994; Erdélyi, *et al.*, 1999; Lierz *et al.*, 2000; Oaks *et al.*, 2004). No entanto, a importância da micoplasmose para a saúde dos rapinantes não está bem documentada. Dada à ausência de sinais clínicos na maior parte dos casos, sugere-se que micoplasmas em aves de rapina ocorrem na maior parte das

vezes como comensais, e em pequena frequência de forma patogênica (Lierz *et al.*, 2008a).

Em anatídeos, comerciais e de cativeiro, pouco se sabe sobre a epidemiologia e transmissão, vias de exposição, como a infecção ocorre, frequência de transmissão vertical e seus efeitos na eclosão dos ovos em aves de vida livre, além de quais fatores podem influenciar na transmissão. As espécies *M. Anatis* e, *M. cloacale* foram identificadas causando doença clínica (Jordaim e Amin, 1980; Ivanics *et al.*, 1988; Samuel *et al.*, 1996). Também em patos domésticos, o *M. anatis* pode causar doenças, afetando o sistema reprodutivo e respiratório, o que pode levar a perdas econômicas pela diminuição da produtividade e de retardo no crescimento dos animais. No entanto, a consequência da infecção por *M. anatis* em aves de vida livre é incerta (SAMUEL *et al.*, 1996).

Senso assim, a vigilância epidemiológica e a biossegurança para aves selvagens que têm contato com aviários comerciais e domésticos deve ser uma preocupação sanitária constante pela possibilidade da transmissão de micoplasmose das aves para as granjas da avicultura comercial e vice-versa (Farmer *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010; Luttrell *et al.*, 2001). Portanto, o monitoramento dos plantéis de aves selvagens para micoplasmoses deve atender às recomendações do PNSA (Nascimento *et al.*, 2006; Brasil, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

As amostras foram processadas no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva na Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG).

4.2 Aves

Foram coletadas cem amostras de aves da espécie *Amazona aestiva* (Papagaio Verdadeiro) do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) do IBAMA de Belo Horizonte, num total de 100 indivíduos que vieram a óbito entre 2008 e 2011. As amostras de coletadas de fígados foram também testadas (Vilela, 2012) em trabalho paralelo para *Chlamydochloa psittaci*.

4.3 Extração do DNA

O DNA dos tecidos (fígado) foi extraído pelo método de adsorção à sílica, de acordo com o protocolo de Boom *et al.*, (1990), modificado por Caxito (2007). A extração foi realizada a partir de aproximadamente 1 cm de material bruto (fígado) previamente macerado com três volumes (600µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e agitação por 15 min. O material obtido foi então submetido à centrifugação por 15 minutos a 4000g e o sobrenadante coletado com o auxílio de uma pipeta. Foram adicionados à mistura 50µL de suspensão de sílica sendo homogeneizada com o auxílio de um vortex e posteriormente colocada em agitador por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 14000g, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O sedimento foi ressuspenso em 1mL de NaI e rapidamente homogeneizado com o auxílio de um vortex. A mistura foi centrifugada por 30 segundos a 14000g e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com 1mL de tampão de lavagem (Etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 14000g todo o tampão de lavagem foi removido com o auxílio de uma pipeta, sendo adicionado 1mL de acetona, homogeneizado por vortex, e centrifugado por 30 segundos a 14000g. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo

com tampa aberta mantido a 37°C por 5 minutos. O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µL de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), incubado a 55°C por 10 minutos e o tubo foi centrifugado por 30 segundos a 14000g para precipitar o sedimento. O sobrenadante (DNA molde) foi removido com o auxílio de uma pipeta e estocado em freezer a -20°C até o PCR.

4.4 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000, o qual permitiu a análise e quantificação de amostras de ácido nucléicos utilizando 1µL da amostra de interesse. Análises computadorizadas dos dados enviados pelo aparelho citado estimou a quantidade de DNA na amostra em ng/µL e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO_{260nm}/DO_{280nm} .

4.5 Amplificação do DNA e Eletroforese em Gel de Agarose

Os oligonucleotídeos iniciadores e as reações de amplificação foram descritos previamente (OIE, 1992). Para a reação de amplificação foram adicionados 100 ng de DNA obtidos na etapa anterior, diluído em 2 µL de água ultrapura (18MΩ) em 48 µL de pré-mix preparado em tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), contendo 1 µL de dNTP a 10 mM, 0,2 µL de Taq polimerase (uma unidade). Foram adicionados 1 µL de iniciadores senso e anti-senso a 10 pmol, sendo respectivamente: Mg 1 (5'-GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC-3'), Mg 2 (5'-GCTTCCTTGC GGTTAGCAAC-3') para *M. gallisepticum* e 35,5 µL de água 18mΩ. As condições de amplificação foram feitas em termociclador, sendo: um ciclo de 94°C por 5 min., 35 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 2 min., um

ciclo 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram detectados em gel de agarose 1% corados em brometo de etídeo e visualizados sob a luz ultravioleta. Durante o PCR foi usado um controle positivo, um controle negativo e um marcador de massa molecular que possibilitou a comparação das medidas dos fragmentos para melhor observar o fragmento estudado de 185 pb. A sequência no GenBak é referenciada pelo número de acesso U23842 (Hnatow et al., 1998).

5. RESULTADOS

Para a realização deste trabalho foram necropsiados 100 papagaios verdadeiros que vieram a óbito no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Belo Horizonte. As amostras de fígado examinadas para o DNA

de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) com metodologia de PCR consagrada, evidenciaram um produto esperado de 185pb, de tamanho molecular em concordância com a literatura (OIE, 1992), estimado por alinhamento com o padrão de tamanho molecular (Fig. 1).

Foram encontradas cinco amostras positivas (5/100) para o DNA de MG, todas as aves com lesões sugestivas (Fig. 2, 3, 4 e 5). Entre as aves positivas, listadas no Quadro 1, destacaram-se a caquexia, congestão ou isquemia gastrintestinal, alterações encontradas em todas as aves positivas, aerossaculite, exceto para ave 671, e positividade em 4/5 (80%) para *Chlamydophila psittaci*, com exceção da ave 833.

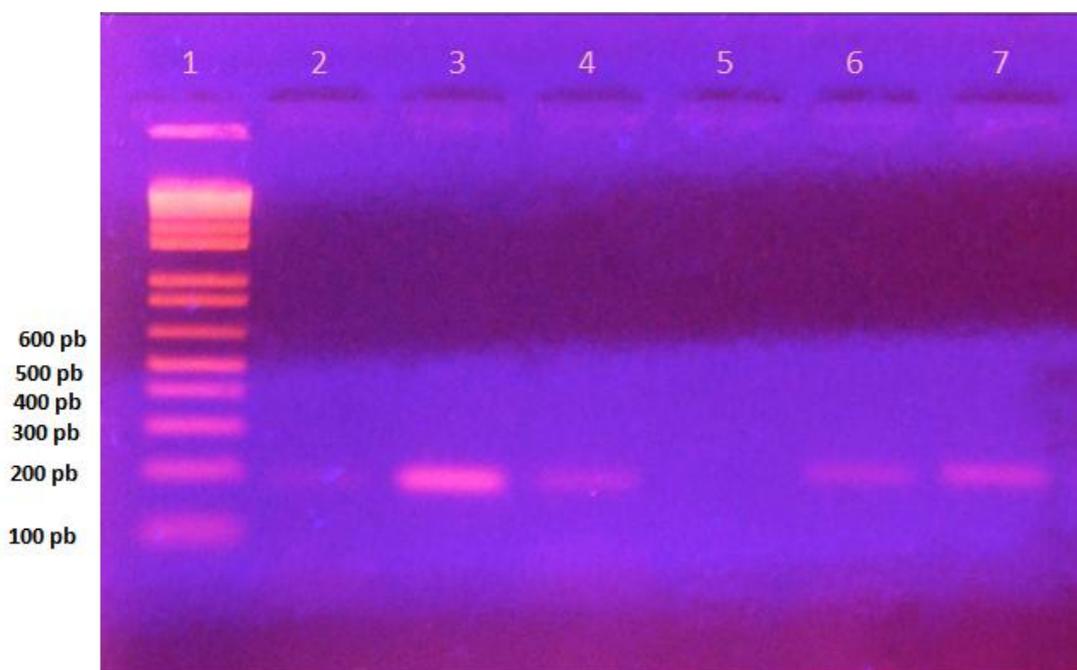


Figura 1. Eletroforese de produtos de PCR para *Mycoplasma gallisepticum* em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta. Canaleta 1: marcador de massa molecular; canaleta 5: controle negativo; canaletas 2, 3, 4, 6 e 7 aves positivas.

Quadro 1. Descrição anátomopatológica de *Amazona aestiva* positivos para DNA de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR (OIE, 1992)

IDENTIFICAÇÃO	ACHADOS DE NECROPSIA E STATUS PARA <i>Chlamydophila psittaci</i>
Ave n° 21	Necropsia realizada dia 09/08/2010, macho, quadro de caquexia, aerossaculite, trato gastrointestinal esbranquiçado, nefromegalia, focos de necrose hepática, moela esbranquiçada, candidíase, rins amarelados. PCR positivo para <i>Chlamydophila psittaci</i> .
Ave n° 612	Necropsia realizada dia 14/09/2009, fêmea, quadro de caquexia, aerossaculite, gastroenterite, pulmão congesto. PCR positivo para <i>Chlamydophila psittaci</i> .
Ave n° 671	Necropsia realizada dia 26/11/2009, macho, quadro de caquexia, esplenomegalia, trato gastrointestinal congesto, nefromegalia, focos de necrose hepática, moela e proventrículo e esbranquiçados. PCR positivo para <i>Chlamydophila psittaci</i> .
Ave n° 717	Necropsia realizada dia 27/12/2009, fêmea, quadro de caquexia, aerossaculite, gastroenterite, hepatomegalia e pulmão congesto. PCR positivo para <i>Chlamydophila psittaci</i> .
Ave n° 833	Necropsia realizada dia 06/03/2010, fêmea, quadro de caquexia, aerossaculite, esplenomegalia, hepatomegalia, necrose hepática, fígado icterico, trato gastrointestinal esbranquiçado, musculatura e órgãos esbranquiçados. Em histopatologia encontrou-se infiltração linfoplasmocitária multifocal e intensa, necrose de coagulação, liquefação, alta difusão plasmocitária, sem congestão pulmonar. PCR negativo para <i>Chlamydophila psittaci</i> .

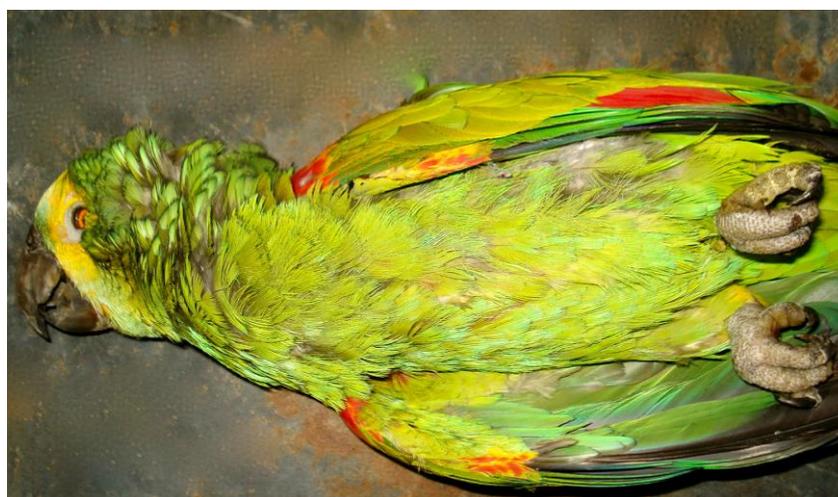


Figura 2. Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). Foto ilustrativa de características da plumagem para determinação da espécie. Cor do empenamento corporal verde; face amarela, testa azul; pescoço, costas e peito com leve escamado mais escuro, espelho vermelho na asa e ombro vermelho. A cabeça pode ser verde e amarela.



Figura 3. Achados anatomopatológicos de caquexia com atrofia da musculatura peitoral em *Amazona aestiva*.



Figura 4. Achados anatomopatológicos em *Amazona aestiva*. Aerossaculite em sacos aéreos torácicos caudais em papagaio verdadeiro oriundo do CETAS (BH/MG).



Figura 5. Achados anatomopatológicos em *Amazona aestiva*. Esteatose em papagaio verdadeiro oriundo do CETAS (BH/MG).

6. DISCUSSÃO

A detecção molecular do produto de 185 pb, usando os primers específicos e preconizados para detecção de MG pela OIE permitiu a confirmação da infecção de *A. aestiva* por *M. gallisepticum* no fígado. Por informações prévias, demonstrou-se que psitacídeos testados estavam 80% concomitantemente infectados por *Chlamydophila psittaci*. Esses resultados suportam a idéia de que, em aves debilitadas, o agente teria potencializada sua capacidade de entrada em corrente sanguínea, permitindo atingir outros órgãos, como no caso, o fígado. Entretanto, em condições naturais, MG está restrito ao trato respiratório e sistema urogenital. Alguns indivíduos tornam-se portadores saudáveis e reservatórios naturais, com importante papel na epidemiologia da doença. Entretanto, os achados de necropsia das cinco aves dificilmente levariam a uma suspeita clínica de micoplasmose (Fig. 3, 4, 5 e 6). O estresse e outros fatores durante a triagem podem ter favorecido o aparecimento dos sinais clínicos e lesões, não sendo, porém, descartada a possibilidade de outras etiologias associadas participarem para o desenvolvimento da patologia apresentada, como infecções concorrentes e oportunistas. As observações encontradas em outras necropsias em aves do mesmo centro de triagem (Vilela, 2012) demonstram a presença de bacterioses, micoses, parasitoses e viroses em ocorrências simultâneas.

O índice de 5% de positividade para MG, detectado em fígados indica que nestas aves haveria infecção sistêmica, com potencial bacteremia e localização circulatória hepática. Embora a infecção predominante por MG tenha localização respiratória, o exame do fígado poderia ser também importante para se levantar especulação sobre a patogenicidade da estirpe. Conforme descrito por Ley (2003), na

maioria das aves portadoras, por sua localização respiratória de baixos níveis de replicação, poderia não ser detectável por exame de fígados. Desta forma, os resultados encontrados podem indicar uma infecção sistêmica mais impactante. Em oposição ao conceito de infecção subclínica, mantida controlada pelo sistema imune, nas aves com detecção hepática, haveria o desequilíbrio da infecção em favor do parasita, possivelmente uma condição avançada e terminal.

O tecido examinado (fígado), o único disponível para este estudo retrospectivo, não é material de eleição e apresentaria menor sensibilidade amostral, o que pode resultar em subavaliação dos índices reais de infecção. Esta hipótese justifica os resultados de Gomes e colaboradores (2010) descritos anteriormente, obtidos por avaliação de traquéias, swabs de fenda palatina e swabs cloacais de psitacídeos em triagem o qual obtiveram maiores índices de positividade.

As condições de manutenção e acomodação em triagem não têm permitido gerenciamento das aves com vistas à biossegurança. Acredita-se que o compartilhamento de infecções e parasitismos seja a regra e tenha importante papel em triagem, podendo representar o fator adicional que define a viabilidade de sobrevivência dos indivíduos resgatados.

As doenças respiratórias estão entre as mais importantes afecções de aves em medicina aviária, ressaltando-se para a importância potencial de *Mycoplasma* como possível etiologia em aves silvestres (Gerlach, 1994). Tendo em vista o crescimento do mercado pet, incluindo de aves, tem-se demandado por estudos para o esclarecimento das etiologias, como forma de permitir o estabelecimento das condições de prevenção (Dorrestein, 2010). Em estudo pioneiro, *Mycoplasma* spp. foi isolado do saco aéreo de um periquito com doença

respiratória (Adler, 1957), que resultou em sua suspeição para aves de companhia, apontadas como possíveis fontes para plantéis de produção. Entretanto, são escassos os estudos sobre micoplasmas em aves selvagens, em contraste com o grande número de estudos em aves industriais (Dorrestein, 2010; Lierz et al., 2008b).

Um problema comum na medicina de aves silvestres em triagem relaciona-se à falta de histórico, usualmente não sendo possível correlacionar efeitos diagnosticados (etiologias) e possível contato com as fontes. Em se tratando de *M. gallisepticum*, torna-se importante a informação sobre proximidade e/ou contato com galinhas e outras aves domésticas de avicultura familiar (fundo de quintal), que podem ter um papel importante como reservatórios e potencial fonte para aves silvestres, inclusive papagaios. A mortalidade de 20% em papagaios verdadeiros selvagens, aparentemente causada por micoplasmose associada a outras bactérias, foi previamente descrita (Bazeman et al., 1982), com o isolamento de *M. gallisepticum* e *M. iowae*. Periquitos australianos submetidos à infecção experimental apresentaram aerossaculite e sorologia positiva para Mg, enquanto frangos SPF desafiados não apresentaram lesão de saco aéreo, embora com conversão sorológica. Os resultados indicaram para variações de estirpes por coevolução com a espécie hospedeira, com efeitos variáveis para infecções cruzadas. Estudos sorológicos (SAR, sorologia rápida em placa) em 1058 pássaros capturados nas proximidades de granjas de aves de produção e em locais de alimentação de pássaros na Geórgia, EUA, revelaram 19.1% reagentes nas proximidades das granjas e 11.6% em locais de alimentação, embora com apenas três tentilhões das proximidades das granjas positivos por PCR (Luttrell et al., 2001). Os resultados parecem indicar maior associação de infecção no entorno de granjas comerciais,

com potencialidade de relação com o uso de vacinas vivas. Esta realidade poderia ocorrer no entorno de granjas com galinhas vacinadas contra MG no Brasil. Ao contrário, um estudo não publicado (Martins, 2011; comunicação pessoal) em traquéias de *Passer domesticus* (n=20) do entorno de granja de poedeiras não vacinadas e livres de Mg, não revelou infecção por Mg por PCR.

O diagnóstico de micoplasma em *Amazona aestiva* em triagem também pode ter implicações ecológicas. As micoplasmoses foram previamente descritas como causadoras de impacto negativo à conservação das espécies. Nos EUA, epizootias de conjuntivite em 1994 e 1995 em tentilhões associadas à infecção por *M. gallisepticum* (Fischer e Converse, 1995; Dhondt, et al, 1998; Duckworth et al., 2003; Ley et al, 2006), podem ter causado a morte cerca de dez milhões destas aves (Nolan et al, 1998). Após a detecção de *Mycoplasma gallisepticum* nos tentilhões, sugeriu-se que os comedouros coletivos podem ter apresentado importante papel epidemiológico, facilitando a transmissão direta e indireta (Hartup et al., 2004).

Estudo prévio no Brasil (Horta et al., 2008), no Centro de Triagem de Belo Horizonte, revelou por PCR a detecção de Mg em 59,2% (29/49) de swabs cloacais de *Amazona aestiva* com sinais clínicos de doença crônica caquetizante, como apatia, emagrecimento progressivo e perda de apetite. Gomes (2010) obteve entre 50% e 80% de positividade de psitacídeos examinados. Ortiz et al. (2009) detectaram, também por PCR para *M. gallisepticum*, infecção em um indivíduo *Amazona aestiva* de companhia, atendido em clínica veterinária com quadro clínico compatível de DCR.

A detecção de MG nas aves estudadas reforça, não apenas a importância de detectar o organismo, mas também a

necessidade da diferenciação genética de MG, com vistas à caracterização genotípica da(s) estirpe(s) e estudos de sua biologia para aspectos como transmissibilidade e patogenicidade.

O diagnóstico etiológico pode identificar o papel, por exemplo, de etiologias infecto-parasitárias, como causa ou potencializadoras de condição existente. Estudos envolvendo o isolamento e identificação de MG, em associação ou não, são necessários em psitacídeos. Um passo importante, embora difícil, será o isolamento da estirpe(s) de micoplasma detectada por PCR. Ainda assim, o sequenciamento dos produtos de PCR pode não ser esclarecedor, já que infecções mistas por estirpes diferentes de Mg não podem ser excluídas. Com o isolamento poder-se-ão infecções experimentais para conduzir estudos de infecciosidade, patogenicidade e determinação de localização da infecção e órgão alvo em psitacídeos.

No Rio de Janeiro, Abreu (2008) avaliou soros (n=120) de codornas (*Coturnix coturnix coturnix*) por SAR, com 100% de negatividade, confirmada por PCR, embora por IH tenham sido detectados 28,3% dos soros com títulos de pelo menos 1:160. Em São Paulo, Duarte (2006) pesquisou micoplasma em 24 amostras de swabe traqueal ou cavidade oral de passeriformes de vida livre (*Saltator similis*, *Passerina brissonii*, *Sicalis flaveola* e *Zonotrichia capensis*) normais, das quais 29% (7/24) foram positivas para *Mycoplasma* spp pela técnica de PCR.

A diversidade de espécies e estirpes de micoplasmas pode refletir na falta de sensibilidade dos testes pré-definidos. Em trabalho em Cathartiformes (Ruder *et al.*, 2009) foi identificado *Mycoplasma corogypsi* como responsável por poliartrite em urubus (*Coragyps atratus*). Outros micoplasmas foram isolados de rapinantes,

como *M. glycyphilum*, *Mycoplasma falconis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma buteonis* e *M. vulturi* (Bolske e Morner, 1982; Poveda *et al.*, 1990, 1994; Erdelyi *et al.*, 1999; Lierz *et al.*, 2000; Oaks *et al.*, 2004). No entanto, a importância das micoplasmoses para a saúde dos rapinantes não está esclarecida, assim como nada se sabe sobre a relevância destas espécies para aves industriais. Entretanto, com a ausência de sinais clínicos na maior parte dos casos, foi sugerida que a infecção de rapinantes ocorre principalmente como comensal, e em pequena frequência de forma patogênica (Lierz *et al.*, 2008a). De aves rapinantes testadas por soroprecipitação rápida em placa – SAR e retestadas por inibição da hemaglutinação (N=66) para *M. gallisepticum*, nenhuma ave foi positiva (Andery *et al.*, 2014).

Em anatídeos comerciais e de cativeiro, as espécies *M. anatis*, *M. cloacale*, foram identificadas causando doença clínica (Jordam *et al.*, 1980; Ivanics *et al.*, 1988; Samuel *et al.*, 1996). Em patos domésticos, *M. anatis* pode causar doença do sistema reprodutivo e respiratório, embora a relevância da infecção em aves de vida livre não seja conhecida (SAMUEL *et al.*, 1996).

No Arkansas (EUA), não foram detectados anticorpos (n=44) contra MG e MS em perus selvagens (*Meleagris gallopavo silvestris*) (Hopkins *et al.*, 1990), condições naturais que diferem da realidade observada no confinamento dos papagaios em triagem aqui descrito. Entretanto, em outras aves selvagens (perus), capturadas na Califórnia, encontrou-se prevalência significativa de anticorpos para MG (8-10%) e MM (33%) (Charlton, 2000), e grande variação (0-87%) de prevalência de anticorpos contra MG, MM e MS em perus selvagens de seis estados americanos (Fritz *et al.*, 1992). O estudo em perus selvagens indica potencialmente a circulação entre aves domésticas e selvagens. Em condições de transmissibilidade, a avifauna, incluindo os

papagaios poderiam ser infectados, principalmente se as condições de manejo não forem adequadas, com impactos sobre aspectos de sua biologia, como viabilidade e reprodução.

Observa-se para *Mycoplasma gallisepticum*, a possível necessidade de vigilância epidemiológica e implementação de biossegurança de aves selvagens em triagem e conservação, especialmente se localizados em regiões com galinhas e outras espécies domésticas, pela possibilidade da transmissão entre os sistemas de criação (Farmer *et al.*, 2005; Luttrell *et al.*, 2001).

6. CONCLUSÕES

Mycoplasma gallisepticum foi detectado em papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) do Centro de Triagem de Animais Silvestres de Minas Gerais (CETAS-MG). Pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi possível a detecção de 5% (5/100) das aves necropsiadas a partir das amostras de fígado.

Os achados de necrópsia das aves positivas por PCR, predominantemente caquexia e aerossaculite, foram sugestivos de doença crônica respiratória, com alterações pulmonares, hepatopatia e perturbações gastrointestinais. A infecção concomitante por *Chlamydophila psittaci* pode representar agravamento e piorar o prognóstico de reabilitação das aves em triagem, assim como outras infecções concomitantes ou oportunistas não estudadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. L. C. *Sorotipagem e gene iss de Escherichia coli e detecção de Mycoplasma gallisepticum em codornas (Coturnix coturnix coturnix) sob inspeção sanitária*. 2008. 93f. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.

ADLER, H. E. Isolation of a pleuropneumonia like organism from the airsac of a parakeet. *Journal of American Veterinarians association*, v. 130, p. 408-409, 1957.

ALDERTON, D. *The ultimate encyclopedia of caged and aviary birds*. 2003. 230 p.

ANDERY, D. DE A.; FERREIRA JÚNIOR, F. C.; ARAÚJO, A. V. DE; VILELA, D. A. DA R.; MARQUES, M. V. R.; MARIN, S. Y.; HORTA, R. S.; ORTIZ, M. C.; RESENDE, J. S. DE; MARTINS, N. R. S. Health assessment of raptors in triage in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 15, n. 3, p. 247-256, 2013.

BASEMAN, J. B.; COLE, R. M.; KRAUSE, D. C.; LEITH, D. K. Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, v. 151, n. 3, p. 1514-1522, 1982.

BOLSKE, G.; MORNER, T. Isolation of a *Mycoplasma sp.* from three buzzards (*Buteo spp.*). *Avian Diseases*, v. 26, p. 406-411, 1982.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN, P. M. E.; VAN DER NOORDA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, p. 495-503, 1990.

INSTRUÇÃO NORMATIVA n. 44, de 23 de agosto de 2001. Anexo. Normas Técnicas para o Controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. melleagridis*). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n. 163, p. 68-70, 24 ago. 2001. Secção 1.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*. Atos legais. Instrução Normativa nº 03 de 09 de janeiro de 2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília – DF, 16 de janeiro de 2002. Seção 1, 278 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Lista nacional de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*. Brasília: MMA, p. 88-97, 2003.
- BUENO, R. C.; BAQUER, S. R.; NAKANO, M. Doenças de aves em São Paulo: análise de 24.214 casos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 29, p. 231-270, 1971.
- CARPENTER, T. E.; MALLINSON, E. T.; MILLER, K. F. *et al.* Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Diseases*, v. 25, p. 404-409, 1981.
- CASTRO, A. G. M. Enfermidades do Sistema Respiratório. In: BERCHIERI, Jr.; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: Facta, 2000. Cap. 2, p. 71-74.
- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E. *et al.* Feline Immunodeficiency Virus Subtype B in Domestic Cats in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary research Communications*, v. 30, n. 8, p. 953-956, 2006.
- CHARLTON, B. R.; BERMUDEZ, A. J., BOULIANNE, M. *et al.* *Whitman and bickford's avian disease manual*. 4. ed. Pennsylvania, EUA: American Association of Avian Pathologists; 1996.
- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Lista das aves do Brasil. Versão 9/8/2009. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- CHARLTON, G. K. Antibodies to selected disease agents in translocated wild turkeys in California. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 36, n. 1, p. 161-164, 2000.
- CHIN, R. P.; YAN GHAZIKHANIAN G.; KEMPF I. *Mycoplasma meleagridis* Infection. In: SAIF Y. M.; BARNES H. J.; FADLY A. M. *et al.* Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press; 2003. p. 744-756.
- CHIN, R. P.; ZHAO, S.; YAMAMOTO, R. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction and isolations procedures in the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from clinical specimens. 42 nd Western Poultry Disease Conference; 1993; Sacramento, California. EUA. p. 81-82.
- CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DAS ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA SILVESTRES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (2009). Appendices I, II and III. Acessado em Jul. 11, 2009. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N. *et al.* *Infecções bacterianas e micóticas: mycoplasmas (PPLo) e formas L*. São Paulo: EDART, 1973, p. 296-297.
- DHONDT, A. A.; TESSAGLIA, D. L.; SLOTHOWER, R. L. Epidemic Mycoplasmal conjunctivitis in house finches from North América. *Journal of wildlife diseases*, v. 34, n. 2, p. 265-280, 1998.
- DHONDT, A. A.; DHONT, K. Y. *et al.* Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches

by fomites. *Avian Pathology*, v. 36, p. 205-208, 2007.

DICKINSON, E. M.; HINSHAW, W. R. Treatment of infectious sinusitis of turkeys with erythromycin and silver nitrate. *Journal of American Veterinary Association*, v. 93, p. 151-56, 1938.

DORRESTEIN, G. M. Passeriformes. In: TULLY JR, T. N., DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. *Clínica de aves*. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 8, p. 150-185.

DUARTE, V. V.; SINHORINI, J. A.; ALLEGRETO, L. *et al.* Resultados obtidos na reabilitação de aves no primeiro ano de trabalho da Associação Bichos da Mata: Identificação de *Mycoplasma spp* em Passeriformes. Itanhaém: Associação Bichos da Mata, 2006. Disponível em: <<http://www.bichosdamata.org.br>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

DUCKWORTH, R. A.; BADIYAEV, A. V.; FARMER, K. L. *et al.* First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *The Auk*, v. 120, n. 2, p. 1-3, 2003.

EPIPHANIO, E. O. B.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; PINTO, R.G.; JORGE, M. A.; SOUZA, M. B.; CACCIOPOLI, J.; CARDOZO, R. M. Resultados preliminares da utilização de cultivos de anéis de traquéia para o estudo de estirpes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n. 2, p. 212-216, 2002.

ERDELYI, K.; TENK, M.; DÀN, A. Mycoplasmosis Associated Perosis Type Skeletal Deformity in a Saker Falcon Nestling in Hungary. *Journal of wildlife diseases*, v. 35, n. 3, p. 586-590, 1999.

FARMER, K. L.; HILL, G E.; ROBERTS, S. R. Susceptibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41, n. 2, p. 317-325, 2005.

FEBERWEE, A.; MEKKES, A.D.R.; WIT, J. J. *et al.* Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. *Avian Diseases*, v. 49, n. 2, p. 260-268, 2005.

FEDDE, M. R. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*, v. 77, n. 8, p.1130-1138, 1998.

FELDMAN, S. H.; WIMSATT, J.; MARCHANG, R. E. *et al.* A novel mycoplasma detected in association with upper respiratory disease syndrome in free-ranging eastern box turtles (*Terrapene Carolina Carolina*) in Virginia. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 42, n. 2, p. 279-289, 2006.

FISCHER J. R.; CONVERSE K. A. Overview of conjunctivitis in house finches in the eastern United States 1994-1995. In: Proceedings of the Joint Conferences AAZV.WDA.AAWV. *American association of Zoo Veterinarians*, p. 508-509, 1995.

FORSHAW, J. M.; KNIGHT F. *Parrots of the World: an identification guide*. New Jersey: Princeton University Press, 2006. p. 37.

FREY M. L.; HANSON R. P.; ANDERSON D.P. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *American Journal of Veterinary Research*, v. 29, p. 2163-2171, 1968.

FRITZ, B. A.; THOMAS, C. B.; YUILL, T. M. Serological and microbial survey of *Mycoplasma gallisepticum* in wild turkeys

(*Meleagris gallopavo*) from six western states.

GARUST, A. T.; NOBREGA P. Doença crônica respiratória no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 23, p. 35-38, 1956.

GERLACH, H. Mollicutes. In: HARRISON, G.J. and HARRISON, L.R. *Clinical avian medicine and surgery*. Philadelphia:Saunders. Cap. 34, p.454-456, 1994.

GOLDBERG, D. R.; SAMUEL, M. D.; THOMAS, C. B. *et al.* The occurrence of mycoplasmas in selected wild North American waterfowl. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 31, p. 364- 371, 1995.

GOMES, A. M.; COSTA, L. L.; VILELA, D. A. R.; MARQUES *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.

GOULART, C. E. S. *Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (Amazona aestiva – Psittacidae) mantidos em cativeiro*. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GWYNNE, J. A.; RIDGELY, R. S.; TUDOR, G. *Aves do Brasil: Pantanal e Cerrado*. São Paulo: Editora Horizonte, 2010. 322 p.

HARTUP, B. K.; KOLLIAS, G. V.; LEY, D. H. Mycoplasmal conjunctivitis in songbirds from New York. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 36, p. 257–264, 2000.

HARTUP, B. K.; DHONDT, A. A.; SYDENSTRICKER, K. V. *et al.* Host Range and dynamics of mycoplasmal

conjunctivitis among birds in north America. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 37, n. 1, p. 72–81, 2001.

HARTUP, B. K.; STOTT-MESSICK, G. M.; LEY, D. H. Health Survey of House Finches (*Carpodacus mexicanus*) from Wisconsin. *Avian Diseases*, v. 48, p. 84-90, 2004.

HAYTER, R. B.; BESCH, E. L. Airborne-particle deposition in the respiratory tract of chickens. *Poultry Science*, v. 53, n. 2, p. 1507-1511, 1974.

HNATOW, L. L.; KEELER JR, C. L.; TESSMER, L. L.; CZYMMEK, K.; DOHMS, J. E. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun.*, v. 66, p. 3436–3442, 1998.

HOFSTADT, M. S. (Ed.), *Diseases of Poultry*. 8. ed., Iowa: Mosby- Wolfe, 1998. p. 187-200.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic Gram negative rods. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Willian &Wilkins, 1994. grupo 5, p.176-222.

HOPKINS, B. A.; SKEELES, J. K.; HOUGHTEN, G. E.; SLAGLE, D.; GARDNER, K. A survey of infectious diseases in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) from Arkansas. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 26, n. 4, p. 468-472, 1990.

HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; MARQUES, M. V. R. *et al.* *Mycoplasma gallisepticum* em *Amazona aestiva* no Centro de Triagem de Animais Silvestres - IBAMA (CETAS) de Belo Horizonte, Minas

Gerai. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2008.

IVANICS, E. R.; GLAVITS, G.; TAKACS, E. *et al.* An outbreak of *Mycoplasma anatis* infection associated with nervous symptoms in large-scale duck flocks. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 35, p. 368-378, 1988.

JORDAIM, F. T. W.; AMIN, M. M. A survey of mycoplasma infections in domestic poultry. *Research in Veterinary Science*, v. 28, p. 96-100, 1980.

KEMPF, I.; GESBERT, F.; GUITTED, M. *et al.* Efficacy of danofloxacin in the therapy of experimental mycoplasmosis in chicks. *Research in Veterinary Science*, v. 53, p.257-259, 1992.

KEMPF, I. Influence of the administration of antibiotics on the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Point-Veterinaire*, v. 23, p. 767-773, 1991

KHAN, M. I.; LAM, L. M.; YAMAMOTO, R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *Avian Disease*, v. 31, p. 315-320, 1987.

KLEVEN, S. H.; KHAN, M. I.; YAMAMOTO, R. Fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from multiple-age layers vaccinated with live F-strain. *Avian Disease*, v. 34, p. 984-990, 1990.

KLEVEN, S. H.; ROWLAND, G. N.; OLSON, N.O. *Mycoplasma synoviae* infection. In: CALNECK, B. W.; BURNES, H. J.; BEARD, C. W.; YODER Jr., H.W. *Diseases of poultry*. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 223-231.

KLEVEN, S. H. *Mycoplasma synoviae*. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A.M. *et al. Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 756-66.

KLEVEN, S. H. *Mycoplasmosis*. In: SAIF, Y.M. (Ed.) *Diseases of poultry*. 11. ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. Cap. 22, p. 719-721.

LEY D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R. *et al. Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press; 2003. p. 722-44.

LEY, D.H.; SHAEFFER D.S.; DHONDT, AA. Further western spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection of house finches. *Journal of wildlife diseases*, v. 42, p. 429-431, 2006.

LEY, D. H.; GEARY, S. J.; BERKHOFF, J. E. *et al. Mycoplasma sturni* from Blue Jays and Northern Mockingbirds with Conjunctivitis in Florida. *Journal of wildlife diseases*, v. 34, p. 403-406, 1998.

LEY, D. H.; ANDERSON, N.; DHONDT, K. V. *et al. Mycoplasma sturni* from a California House Finch with Conjunctivitis Did Not Cause Disease in Experimentally Infected House Finches. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 46, n. 3, p. 994-999, 2010.

LIERZ, M.; SCHIMIDT, R.; BRUNNBERG, L. *et al.* Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from Free-ranging Birds of Prey in Germany. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 47, p. 63-67, 2000b.

LIERZ, M.; SCHMIDT, R.; GOEBEL, T. *et al.* Detection of *Mycoplasma* spp. in raptorial birds in Germany. In: LUMEIJ, J. T.; REMPLE, J. D.; REDIG, P. T. *et al.* (Eds.). *Raptor biomedicine III*. Lake Worth, Florida: Zoological Education Network Inc., 2000a. p. 25-33.

- LIERZ, M.; HAGEN, N.; LUESCHOW, D. *et al.* Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. *Avian Pathology*. v. 37, n. 5, p. 471-476, 2008b.
- LIERZ, M.; HAGEN, N.; HERNADEZ-DIVERS, S. J. *et al.* Occurrence of Mycoplasmas in Free-ranging Birds of Prey in German. *Journal of Wildlife Diseases*. v. 44, n. 4, p. 845-850, 2008a.
- LUTTRELL, M. P.; STALLKNECHT, D. E.; KLEVEN, S. H. *et al.* Mycoplasma gallisepticum in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Dis.*, v. 45, n. 2, p. 321-329, 2001.
- MACARI, M.; GIVISIEZ, P. E. N. Fisiologia Respiratória. In: *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte*. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. Cap. 3, p. 37-49.
- MARKHAM, F. S.; WONG, S. C. Pleuropneumonia-like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. *Poultry Science*, v. 31, p. 902-904, 1952.
- MARKHAM, J. F.; SCOTT P. C.; WHITHEAR, K. G. *Field and laboratory studies on a live attenuated Mycoplasma Synoviae vaccine*. International Organization for Mycoplasma Letters 1996; 4:286.
- MARTINS; N. R. S. Mycoplasma gallisepticum em Passer domesticus em Igarapé, MG. *Escola de Veterinária: UFMG. e-mail nrsmart@gmail.com.* (no prelo).
- MASHIMA, T. Y.; LEY, D. H.; STOSKOPF M. K. Evaluation of treatment of mycoplasma gallisepticum associated conjunctivitis in house finches. *Journal of avian medicine and surgery*, v. 11, p. 20-24, 1997.
- MENSAH, G. A.; BRAIN, J. B. Deposition and clearance of inhaled aerosol in the respiratory tract of chickens. *Journal of Applied Physiology*, v. 53, n. 6, p. 1423-1428, 1982.
- NASCIMENTO, E. R.. *Isolamento e Classificação de Mycoplasma gallisepticum em aves*. XVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1982; Camboriú, SC. Brasil. p. 76.
- NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K. R.; TAIT, R. C. Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum. *Avian Diseases*, v. 35, p. 62-69, 1991.
- NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; KLAN, M. I. Mycoplasma gallisepticum F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v. 37, p. 203-211, 1993.
- NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R. *Simplification of Mycoplasma gallisepticum- polymerase chain reaction*. 40 th Western Poultry Disease Conference; 1991; Acapulco, Mexico. p. 94-95.
- NASCIMENTO, E. R. PCR versus isolamento e sorologia no diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas e perus. In: Conferência APINCO 1994 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994, Santos. Anais da Conferência APINCO 1994 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas: FACTA , 1994. p. 89-90.
- NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F. *Eradication of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae from a chicken flock in Brasil*. 43 rd Western

- Poultry Disease Conference; 1994; Sacramento, Califórnia. USA. p. 68.
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO *et al.* Avian Mycoplasmosis Update. *Brazilian Journal of Poultry Science*. v. 7, n. 1, p. 01-09, 2005.
- NASCIMENTO, E. R.; POLO, P. A.; PEREIRA, V. L. A. *et al.* Serologic Response of Spf Chickens to Live Vaccines and other Strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 8, n. 1, p. 45–50, 2006.
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI, A. J. *et al.* *Doenças das Aves*. 3. ed. São Paulo: Facta, 2009. p. 485-500.
- NYE, R. R. Sistema Respiratório Aviário. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. *Clínica de Pequenos Animais*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 164. p. 1568-1571.
- OAKS, J. L.; DONAHOE, S. L.; RURANGIRWA, F. R. *et al.* Identification of a novel mycoplasma species from an Oriental white-backed vulture (*Gyp bengalensis*). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 5909-5912, 2004.
- Office International des Epizooties. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for list A and B diseases of mammals, birds and bees. 2. ed. Paris; 1992.
- OLIVEIRA, R. L. Micoplasmose animais: Frequência de *M. gallisepticum* em galinhas em Minas Gerais. *Arquivos de Veterinária*, v. 25, p. 271, 1973.
- OLSEN, G.; SPEER, B. Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for psittacine beak and feather disease virus. *Journal of Avian medicine and Surgery*, v. 23, p. 194-198, 2009.
- ORTIZ, A.; FROYMAN, R.; KLEVEN, S. H. Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, v. 39, p. 830-836, 1995.
- ORTIZ, M. C.; GOMES, A. M.; CARVALHAES, A. G.; MARTINS, N. R. *Doença Crônica Respiratória em Papagaio Verdadeiro (Amazona aestiva)*: Relato de caso. In: Congresso ABRAVAS, 12, 2009, Águas de Lindóia. *Anais do XII Congresso ABRAVAS*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2009.
- PIÇARRA, J. P. S. C. *Estudo sobre a detecção do Circovirus Aviário em psitacídeos domésticos na região de Barcelona – Espanha*. 2009. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica De Lisboa.
- POVEDA, J. B.; GIEBEL, J.; KIRCHHOFF, H.; FERNANDEZ, A. Isolation of mycoplasmas from a buzzard, falcons and vultures. *Avian Pathology*. v. 19, p. 779-783, 1990.
- POVEDA, J. B.; GIEBEL, J.; FLOSSDORF, J. *et al.* *Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma gypis* sp. nov., three species from birds of prey. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 94–98, 1994.
- RAZIN, S.; TULLY, J. G. *Methods in mycoplasmaology: mycoplasma characterization*. New York: Academic Press; 1983. v. 1, 504 p.
- RAZIN, S.; TULLY, J. G. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: molecular characterization*. San Diego: Academic Press. v.1, p.215-265, 1995.

- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology*. v. 62, p.1094-1156, 1998.
- RESENDE, M.; REIS, R.; ORNELLAS-SANTOS PP. Micoplasma de Origem Aviária. II. Caracterização do *Mycoplasma gallisepticum*. *Arquivos da Escola de Veterinária*. v.21, p.151-156, 1969.
- ROBERTS, S.R.; NOLAN, P.M.; HILL, G.E. Characterization of the mycoplasma conjunctivitis epizootic in a house finch population in the southeastern United States. *Journal of Wildlife Disease*. v. 37, p.82-88, 2001.
- ROBERTS, S.R. First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *The Auk*, v.120, n.2, p. 1-3, 2003.
- ROSALES, A. G. *Enfermidades Respiratórias en el Pollo de Engorde*. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas; 1991; Campinas, São Paulo. P. 163-76.
- SAMUEL, M. D. ; GOLDBERG, D. R. ; THOMAS, C. B. *et al.* Exposure of wild waterfowl to *Mycoplasma anatis*. *Journal of wildlife disease*, v.12 p.331-337, 1996.
- SANTOS, C.H.C.; SILVA, E. N. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. IN: Berchieri Jr., A.; Macari, M. *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, 505 p., cap. 3, p. 171-182, 2000.
- SILVEIRA, R. M.; FIORENTIN, L.; MARQUES, E. K. Polymerase Chain Reaction Optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* Diagnosis. *Avian Diseases*, v. 40, p. 218-222, 1996.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira: uma introdução*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro: Ed Nova Fronteira, 1997, 792 p.
- STASTNY, K.; BEJCEK, V. *Enciclopédia das Aves: as várias espécies e seus habitats*. São Paulo: 2002. v. 15, 288 p.
- STIPKOVITS, L.; BURCH, D. G. S. *Comparative studies on the efficacy of Mycoplasma gallisepticum bacterin and tiamulin treatment of breeder hens*. 0th European Poultry Conference; 1994; Glasgow. United Kingdom, v. 1, p. 171-172.
- STIPKOVITS, L.; KEMPFT I. Mycoplasmoses in poultry. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties*, v. 15, p. 1495-525, 1996.
- TANNER, A. C.; AVAKIAN A. P.; BARNES, H. J. *et al.* A comparison of danofloxacin and tylosin in the control of induced *Mycoplasma gallisepticum* infection in Broiler chicks. *Avian Diseases*, v. 37, p. 515-522, 1993.
- TOTH, T. E.; PYLE, R. H.; CACECI, T *et al.* Cellular defense of avian respiratory system: influx and nonopsonic phagocytosis by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, v. 56, n. 5, 1988.
- VILELA, D. A. R. Diversidade da avifauna encaminhada para os centros de triagem de animais silvestres (CETAS) do Brasil e ocorrência de clamidiose aviária em Amazona aestiva no CETAS do IBAMA em Belo Horizonte, MG. 2012. 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). Escola de Veterinária UFMG (no prelo).
- VILLA, M. F. G. *Programa Nacional de Sanidade Avícola: 1994 a 1998*. Conferência APINCO de Ciência e

Tecnologia Avícolas; 1998; Campinas, São Paulo. Brasil. p. 34-46.

WHITFORD, W. H.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. C. J. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State Press, 1994. 172 p.

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

YAMAMOTO, R. Mollicutes. In: BIBERSTIEIN, E. L.; ZEE, Y. C. Review of veterinary microbiology. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1990. p. 213-227.

YODER Jr., H. W. Mycoplasmosis In: CALNEK, B.W, BURNES, H.J., BEARD C.W., YODER, Jr., H.W. Diseases of Poultry. 9. ed. Ames: Iowa State University Press; 1991a. p. 196-198.