

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* E
METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO EM PLANTEIS AVÍCOLAS
COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE DAS REGIÕES
SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL**

**Caroline Tostes Secato
Bióloga**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* E
METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO EM PLANTEIS AVÍCOLAS
COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE DAS REGIÕES
SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Caroline Tostes Secato

Orientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2019

S444o Secato, Caroline Tostes
Ocorrência de *Mycoplasma gallisepticum* e metapneumovírus aviário em plantéis avícolas comerciais de frangos de corte das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil / Caroline Tostes Secato. -- Jaboticabal, 2019
56 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Helio José Montassier

1. Enfermidades respiratórias. 2. Galinhas. 3. Micoplasmose. 4. Pneumovirose aviária. 5. Diagnóstico molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* E METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO EM PLANTEIS AVÍCOLAS COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE DAS REGIÕES SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL

AUTORA: CAROLINE TOSTES SECATO

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER 
Departamento de Microbiologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO 
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. KETHERSON RODRIGUES SILVA 
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 27 de setembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Caroline Tostes Secato – nascida em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, em 23 de agosto de 1995. Ingressou no Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado – eixo de biotecnologia) em 2013 na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de bióloga em 2016. Durante a graduação fez dois anos (2014 - 2016) de iniciação científica no Laboratório de Imunoparasitologia e Parasitologia, Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Jaboticabal, com o projeto intitulado “Detecção Molecular De Micoplasmas Hemotróficos Em Canídeos Selvagens E Domésticos No Pantanal Sul-Matogrossense”, onde foi bolsista FAPESP (Processo 2016/01216-5). Ingressou no curso de mestrado em março de 2017, no programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Câmpus Jaboticabal).

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio José Montassier, por todos os ensinamentos e por toda ajuda durante o meu período de mestrado.

À Dr. Maria de Fátima Silva Montassier por todo ensinamento, toda ajuda e todos os conselhos.

Ao Dr. Romeu Moreira dos Santos pela amizade, pelos ensinamentos sobre as técnicas e sobre a rotina do laboratório, por todos os conselhos e conversas de apoio.

Aos amigos de outros laboratórios Marita, Natália, Mariana, Lívia, Ana Cláudia, Igor, Kaio e Victória pela parceria, companheirismo, ajuda e auxílio.

A todos os pesquisadores e funcionários que fazem parte do Laboratório de Microbiologia, que me auxiliaram nesta jornada.

À minha família que me apoiou, incentivou e confiou no meu esforço e trabalho, e esteve comigo nas horas em que mais precisei.

Ao meu marido Welerson por todo apoio que me deu durante esse período e por estar sempre ao meu lado durante todo o tempo de mestrado.

Ao Programa do Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp.

À Prof^a. Dr^a. Daniela Gomes da Silva e ao Prof. Dr. Ruben Pablo Schoken-Iturrino pela disponibilidade em participar de minha banca de qualificação do mestrado.

Às aves, que cederam suas vidas para esse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Micoplasmoses respiratórias por <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	3
2.2. Metapneumovírus aviário (AMPV).....	11
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Estirpes de Referência.....	19
4.2. Espécies amostradas, área de estudo e colheita das amostras.....	19
4.3. Extração de DNA para a análise molecular de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> das amostras de suabes nasais e traqueais.....	19
4.4. Extração de RNA para a análise molecular de Metapneumovírus Aviário das amostras de suabes nasais e traqueais.....	20
4.5. Detecção molecular de <i>M. gallisepticum</i> e metapneumovírus aviário..	20
4.5.1. Primers utilizados na Detecção molecular de <i>M. gallisepticum</i> e metapneumovírus aviário.....	20
4.5.2. PCR convencional para <i>M. gallisepticum</i> dirigida ao gene <i>mgc2</i>	21
4.5.3. Nested-RT-PCR para a detecção e a identificação dos subtipos A e B do metapneumovírus aviário.....	22
4.6. Eletroforese em Gel de Agarose.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33
8. ANEXO.....	40



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização molecular de *Mycoplasma gallisepticum* e Metapneumovírus aviário em planteis avícolas comerciais de frangos de corte do estado de São Paulo, Brasil**", protocolo nº 008022/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de junho de 2018.

Vigência do Projeto	01/09/2018 a 01/07/2019
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i>
Nº de animais	87 amostras, sendo cada uma formada por um pool de 10 swabs traqueais
Peso / Idade	Não identificado
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Abatedouros do Estado de São Paulo

Jaboticabal, 14 de junho de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Ocorrência de *Mycoplasma gallisepticum* e Metapneumovírus aviário em planteis avícolas comerciais de frangos de corte das Regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil

RESUMO - As infecções do trato respiratório de aves têm-se constituído em problemas crescentes e com marcantes consequências negativas sobre a produção avícola em várias partes do mundo, notadamente onde a avicultura é mais desenvolvida como no Brasil. Dentre essas enfermidades, destacam-se as micoplasmoses aviárias e a pneumovirose aviária, que, apesar de suas relevâncias em sanidade avícola, não têm sido investigadas de forma sistematizada no Brasil, em especial no que concerne à interação entre esses agentes ou a ocorrência de co-infecção em frangos de corte. O presente estudo investigou a ocorrência de infecção por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e pelos subtipos A ou B de Metapneumovírus aviário (AMPV) em frangos de corte de planteis avícolas comerciais mantidos em granjas mais tecnificadas localizadas nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Para tanto, as técnicas de PCR e de RT-Nested-PCR foram usadas na detecção e/ou identificação, respectivamente de MG e AMPV em amostras de suabes nasais e traqueais colhidos de 87 lotes de frangos de corte com problemas respiratórios e oriundos de 15 granjas de produção comercial de frangos de corte. Dos lotes amostrados, dois deles em um total de 87 (2,3%) e de uma única granja da região Sudeste, mostraram-se positivos para MG, enquanto que nenhum dos lotes investigados revelou-se positivo para AMPV. A baixa ou nenhuma incidência desses agentes pode ser explicada pela utilização de medidas cada vez mais efetivas para o controle sanitário desses agentes nas granjas comerciais de frangos de corte amostradas. Os achados nesta pesquisa sugerem também, entretanto, que outros agentes infecciosos bacterianos e virais, não investigados nesse estudo, podem estar envolvidos na etiologia dos problemas respiratórios dessas aves, já que aquelas que foram amostradas no presente estudo apresentavam sinais clínicos de doenças respiratórias, de modo que esses outros agentes devem ser também no futuro investigados e monitorados, ou por técnicas diagnóstico molecular ou de soro-diagnóstico nessas mesmas granjas de frangos de corte.

Palavras-chave: Enfermidades respiratórias, galinhas, micoplasmose, pneumovirose aviária, diagnóstico molecular.

Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* and avian Metapneumovirus in commercial poultry farms of broiler chickens in the Southeast and Midwest Regions of Brazil

ABSTRACT - Respiratory infections of poultry may be an increasing and negative problem with poultry production in several parts of the world, especially when poultry farming is more widely used than in Brazil. These diseases include avian mycoplasmosis and avian pneumovirus, which, despite their relevance in poultry health, have not been systematically investigated in Brazil, especially with regard to the interaction between these agents or the occurrence of co-infection in broilers. The present study investigated the occurrence of infection by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and A or B subtypes of avian Metapneumovirus (AMPV) in broiler commercial poultry farms located in the Southeast and Center-West regions of Brazil. For this, PCR and RT-Nested-PCR techniques were used in the detection and / or identification, respectively of MG and AMPV in nasal and tracheal swab samples collected from 87 lots of broilers with respiratory problems and from 15 commercial production of broilers. Of the sampled lots, two of them in 87 (2.3%) were positive for MG, whereas none of the lots were positive for AMPV. The low or no incidence of these agents can be explained by the use of increasingly effective measures for the sanitary control of these agents in the commercial farms of sampled broilers. Our findings also suggest, however, that other bacterial and viral infectious agents not investigated in this study may be involved in the etiology of the respiratory problems of these birds, since those that were sampled in the present study had clinical signs of respiratory diseases, so that these other agents should also be investigated and monitored in the future, or by molecular diagnostic or serum-diagnostic techniques in these same broiler farms.

Keywords: Respiratory disorders, chickens, mycoplasmosis, avian pneumovirus, molecular diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABPA** – Associação Brasileira de Proteína Animal
- AFLP** - Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
- AIV** – Vírus da Influenza Aviária
- AMPV** – Metapneumovírus Aviário
- APV** – Pneumovírus Aviário
- CCU** – Unidade de Mudança de Cor
- cDNA** – Ácido Desoxirribonucleotídeo complementar (DNA complementar)
- DEPC** - Dietil Pirocarbonato
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleotídeo
- DNTPs** - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA** – Ensaio De Imunoabsorção Enzimática
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- Glicoproteína F** – Glicoproteína de Fusão
- Glicoproteína G** – Glicoproteína de Ligação
- Glicoproteína L** – Glicoproteína da RNA-polimerase
- Glicoproteína N** – Glicoproteína de Nucleocapsídeo
- Glicoproteína P** – Fosfoproteína
- HI** – Teste de Inibição da Hemaglutinação
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IHQ** – Técnica de Imuno-histoquímica

MEM – Meio Mínimo de Eagle

MG – *Mycoplasma Gallisepticum*

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MI – *Mycoplasma imitans*

M-MLV – Enzima de Transcrição Reversa

MS – *Mycoplasma Synoviae*

NCRA – Associação Regional Centro-Norte

NDV – Vírus da Doença de Newcastle

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

PFGE – Eletroforese Em Gel De Campo Pulsado

PLTs – Tratamento de Ninhadas de Aves

PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola

PPLO – Usado para o isolamento e cultivo de *Mycoplasma* spp. em um ambiente de laboratório

PPM – Parte por Milhão

RAPD – DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente

RFLP – Análise Do Polimorfismo De Comprimentos De Fragmentos De DNA Gerados Por Clivagem Com Enzimas De Restrição

RNA – Ácido Ribonucleotídeo

RNase OUT – Inibidor de Ribonuclease Recombinante

RT-PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase utilizando Transcrição Reversa

SAR – Reação de soroaglutinação

SN – Soroneutralização

SYBR Gold – Corante Utilizado Para Preparação do Gel De Agarose

TEB – Tampão Tris-Borato-EDTA

TPB – Caldo Triptose Fosfato

TRT – Vírus da Rinotraqueíte de Perus

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de frango do mundo produzindo 12,69 milhões de toneladas em 2018, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América, sendo também o maior exportador global de carne de frango do mundo, com 3,687 milhões de toneladas exportadas no ano de 2018 (UBABEF, 2015; IBGE, 2017, EMBRAPA, 2018), considerando todos os produtos (*in natura*, embutidos, processados), segundo dados divulgados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2015). Seu consumo no mesmo ano foi em média de 41,8 kg por pessoa (UBABEF, 2015; IBGE, 2017).

Nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros países do mundo, as doenças infecciosas respiratórias são as principais responsáveis pela mortalidade e pelas condenações de carcaças na indústria avícola. Dessa forma, os produtores e os especialistas em sanidade avícola consideram as doenças respiratórias como as de maior importância econômica. Quase a totalidade das condenações de carcaças nos abatedouros avícolas nos EUA é devida à aerossaculite e sepsise que, na sua maioria, são alterações decorrentes de doenças infecciosas respiratórias ocasionadas principalmente por infecção pela bactéria *Escherichia coli*, embora outros patógenos também estejam implicados (NCRA, 2009).

Os patógenos respiratórios podem causar alta mortalidade e morbidade em aves. Ademais, as aves infectadas apresentam síndromes respiratórias e outros sinais clínicos, como tosse, dificuldade respiratória, crescimento ou produção reduzidos, levando a grandes perdas econômicas (Jones, 2010). Infecções mistas por diferentes agentes respiratórios podem ocorrer em decorrência do uso extensivo de múltiplas vacinas vivas, altas populações geográficas e densidades habitacionais. Infecções mistas envolvendo micoplasmas e outros agentes patogênicos virais respiratórios são reconhecidos em galinhas (Jones, 2010; McKissick, 2006).

As doenças infecciosas que acometem o trato respiratório de galinhas, ou como sítio primário de multiplicação, ou como tecidos e órgãos de tropismo preferencial, constituem-se em um desafio muito grande para o bom desempenho do

setor produtivo avícola. Dentre essas enfermidades infecciosas destacam-se nas criações avícolas de várias partes do mundo a micoplasmose por *M. gallisepticum* e a pneumovirose aviária, que apresentam como característica importante a capacidade de promoverem infecções persistentes nas aves afetadas e que são caracterizadas pela rápida e eficiente disseminação por via aerógena e, que no caso do MG, pode ocorrer verticalmente. Isso tudo dificulta enormemente a adoção de medidas mais efetivas de controle, as quais dependem diretamente da aplicação de meios de diagnóstico apropriados e eficientes para a geração de dados epidemiológicos mais consistentes dessas enfermidades os quais são imprescindíveis para uma melhor fundamentação para a adoção de medidas de controle mais eficazes.

Além disso, o AMPV adquire importância adicional, não somente por sua capacidade de induzir alterações patológicas e sinais clínicos relevantes em aves de produção, mas também em eventuais processos de coinfeção, por favorecer a instalação e exacerbar os efeitos patológicos nessas mesmas aves de patógenos bacterianos, tais como o *M. gallisepticum*.

Em vista de todo o exposto e levando-se em consideração a falta de informações mais sistematizadas e atualizadas a respeito da epidemiologia das infecções por *M. gallisepticum* e por AMPV em criações comerciais de frangos de corte no Brasil, foi proposto este estudo que objetiva detectar e identificar *M. gallisepticum* e os subtipos A e B de AMPV em amostras de suabes traqueais e nasais de frangos de corte das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micoplasmoses respiratórias por *Mycoplasma gallisepticum*

Micoplasmas são os menores procariontes com capacidade de auto-replicação (Razin, 1992; Razin et al. 1998; Tan et al., 2013), sendo desprovidos de paredes celulares e limitados apenas por uma membrana plasmática (Baseman e Tully 1997; Razin, 1992; Tan et al., 2013). Devido a isso, são resistentes a antibióticos que afetam a síntese da parede celular (Kleven, 2003; Tan et al., 2013). Algumas espécies de micoplasmas apresentam hospedeiro específico, enquanto outras são capazes de infectar várias espécies de animais. Alguns micoplasmas colonizam apenas membranas mucosas e a maioria desses microrganismos permanecem não invasivos. Porém, outras como *Mycoplasma gallisepticum*, são capazes de penetrar nas células (Kleven, 2003; Tan et al., 2013). As micoplasmoses aviárias têm sido caracterizadas pelas formas clássicas de enfermidades, que causam: doença respiratória crônica das aves, sinusite infecciosa, sinovite infecciosa e aerossaculite, que resultam em diminuição da produção de ovos, redução da taxa de crescimento e diminuição da eclosão em aves de produção (Ley et al., 1997; Tan et al., 2013). As espécies de micoplasmas patogênicos de importância para avicultura são *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* e *M. iowae* (Tan et al., 2013).

Mycoplasma galissepticum (MG) é um patógeno que causa uma infecção aguda importante em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e perus (*Meleagris gallopavo*), especialmente nas aves jovens, nas quais causam doenças respiratórias com diferentes lesões e manifestações clínicas, (Bradbury, 2001; Ley, 2003ab; OIE, 2008a), sendo os perus mais susceptíveis (OIE, 2008a). Essa bactéria pertence à classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae. Ademais, sabe-se que o MG, juntamente com uma outra espécie, o *Mycoplasma synoviae* (MS) são considerados os mais importantes dos micoplasmas patogênicos e economicamente significativos para as aves de produção, ocorrendo em todas

regiões do mundo. As perdas econômicas decorrentes da condenação de carcaças, a redução da eficiência na alimentação e na produção de ovos e o aumento dos custos com medicamentos são fatores adicionais que tornam este um dos mais onerosos problemas de doenças enfrentados pela produção comercial de aves no mundo inteiro (Ley, 2003a,b; Raviv et al., 2006; OIE, 2008a). Além de galinhas e perus, esses patógenos acometem aves de caça, podendo causar, nestas, doenças que afetam mais o trato respiratório superior. Além disso, *Mycoplasma gallisepticum* foi detectado como causador de conjuntivite em tentilhões domésticos na América do Norte (Luttrell et al., 1996; OIE, 2008a).

Ainda, o MG se caracteriza também por causar infecções em aves de produção que variam desde formas subclínicas àquelas com evidentes sinais clínicos, como coriza, conjuntivite, tosse e espirros e presença de exsudato nasal e respiração através do bico parcialmente aberto (Raviv et al., 2006; OIE, 2008a). Como a infecção por essa bactéria começa com a colonização do trato respiratório, traqueíte e aerossaculite são achados predominantes de uma infecção por este patógeno em galinhas. Em algumas situações, as infecções por *M. gallisepticum* também estão associadas à artrite, salpingite, conjuntivite e encefalopatia fatal (Much et al., 2002), indicando que esse microrganismo é capaz de atravessar a barreira epitelial da mucosa e atingir órgãos e tecidos internos no organismo hospedeiro (Vogl et al., 2007). Experimentalmente, tem sido demonstrado que este patógeno é capaz de se espalhar pelo organismo da ave, após a infecção por aerossol, como demonstrado pelo reisolamento de *M. gallisepticum* do coração, cérebro, fígado, baço e rins de frangos infectados experimentalmente (Much et al., 2002; Vogl et al., 2007).

A transmissão de *M. gallisepticum* pode ser tanto vertical como horizontal. A transmissão vertical ocorre por meio de ovos produzidos por galinhas infectadas. Já a transmissão horizontal acontece por contato direto entre aves infectadas e outras susceptíveis, especialmente em granjas com alta densidade populacional (OIE, 2008a; Tan et al., 2013). Pode também ocorrer a transmissão horizontal indireta, através de gotículas de aerossóis contaminados, poeira, penas, fômites e por trabalhadores da granja. (Kleven, 1997; Tan et al., 2013).

Desde 1954, a micoplasmose aviária tem sido considerada um problema de elevada relevância em granjas de frangos no Japão e em outros países asiáticos. No

Japão, as infecções por *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foram confirmadas em granjas de frangos afetados por doença respiratória ou sinovite em 1962 e 1973, respectivamente (Osman et al., 2008). Em outros países asiáticos, incluindo Bangladesh, Índia, Indonésia, República Popular da China, Coreia, Malásia, Filipinas, Taipei China, Tailândia e Vietnã, bem como Israel, a ocorrência de micoplasmose em plantéis de frangos foi reconhecida por técnicas sorológicas ou por métodos de detecção e/ou isolamento do agente etiológico (Sato et al., 1996; Levisohn et al., 2000; Osman et al., 2008).

Kempf et al. (1993), na França, fizeram um estudo no qual inocularam o *M. gallisepticum* experimentalmente em frangos com cinco semanas de idade, sendo que antes da inoculação, esses animais foram divididos em três grupos e criados em três isoladores separados. Cada grupo foi inoculado por via intratraqueal com as seguintes estirpes: (1) estirpe R-P10 de *Mycoplasma gallisepticum*; (2) estirpe 41-91 de *M. gallisepticum*; (3) estirpe 84355 de *M. iowae*. Amostras de sangue foram colhidas para a separação de soros, que foram submetidos à detecção de anticorpos contra o MG pelos testes de aglutinação rápida (SAR) e de inibição da hemaglutinação (HI). Suabes traqueais foram colhidos para que fosse feita a tentativa de re-isolamento e analisada a cultura de micoplasma e sua posterior detecção por PCR. Como resultado do teste SAR, foram detectadas aglutininas em soros de todas as aves inoculadas oito dias após a inoculação. Os primeiros resultados positivos de HI foram observados entre o 15^o e o 20^o dia p.i. Em aves inoculadas com MG R-P10 e MG 41-91, respectivamente, observou-se que a cultura foi positiva em 49 das 73 amostras, enquanto que a PCR detectou 70/72 amostras positivas, mostrando que a maior percentagem de amostras positivas foi obtida por PCR e hibridização (mais de 97%) em comparação com cultura de MG (67%).

No Egito, Osman et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a prevalência de infecção pelo *M. gallisepticum* em frangos de corte e em matrizes de frangos de corte selecionados no Egito, utilizando técnicas convencionais de re-isolamento e cultura e caracterização bioquímica, além de PCR, para detectar e identificar essa bactéria em amostras colhidas de aves saudáveis e doentes mantidas em criações a campo. Para este estudo foram colhidas amostras de pulmões e traqueia, bem como suabes traqueais, sendo esses últimos analisados por PCR. Além disso, foram realizadas colheitas de sangue para a separação de

soro e realização de análises sorológicas para a detecção de anticorpos contra *M. gallisepticum*, utilizando as técnicas de soroaglutinação (SAR) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Observou-se, como resultado, que, das 279 amostras de suabes traqueais coletados, 131 apresentaram resultados positivos utilizando PCR específica para *M. gallisepticum*. 55 das 279 amostras também resultaram-se positivas por técnicas de re-isolamento em meios apropriados de cultura.

Hossam et al. (2016) no Egito, investigaram a infecção por *M. gallisepticum* em aves comerciais utilizando os seguintes métodos: (1-) PCR em amostras colhidas após 48 horas de incubação de caldo PPLO (Pleuro Pneumonia-Like Organisms) e (2-) PCR direta em amostras de tecido infectado, as quais foram comparadas com o método de cultura. O estudo incluiu 385 aves, das quais foram coletadas 1.155 amostras de traquéia, tecido pulmonar e sacos aéreos, sendo que as coletas foram realizadas após a morte dessas aves. Como resultado, observou-se que a PCR em amostras colhidas após 48 horas de incubação de caldo PPLO gerou um resultado de 70,9% de amostras positivas. A positividade das amostras advindas diretamente de tecido infectado obteve um percentual de positividade de 65,45%. A técnica que apresentou o menor percentual de amostras positivas foi o método de cultivo convencional (17,66%), indicando que a PCR é mais sensível. Por outro lado, no estudo da distribuição tecidual de MG verificou-se que a presença dessa bactéria foi maior na traqueia, seguido de sacos aéreos e pulmão.

No Brasil, Minharro et al. (2001), realizaram um estudo que teve como objetivo determinar a frequência de infecções por *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *Escherichia coli* em frangos abatidos sob Inspeção Federal no Estado de Goiás, tendo sido colhidas 139 amostras de lesões de sacos aéreos, em aves oriundas de 31 lotes e que foram abatidas entre o período de 22 de janeiro a 02 de agosto de 1999. Essas amostras foram analisadas por cultura bacteriológica para diagnóstico de *Escherichia coli*. A detecção e a identificação de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foram feitas através da técnica de PCR convencional. Pela bacteriologia, 49,64% das amostras se mostraram positivas para *Escherichia coli*. Já pela técnica de PCR, em 32,25% identificou-se a presença de *Mycoplasma gallisepticum* e em 25,80% constatou-se a presença de *Mycoplasma synoviae*. Infecções mistas por *E. coli*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foi verificada em 9,68% dos 31 lotes, enquanto que associações entre *E. coli* e *M. gallisepticum* ocorreram em 12,90% das amostras. Já,

associação de *E. coli* e *M. synoviae* se mostrou presente em 16,13% das amostras. Em nenhum dos lotes estudados foi constatada a ocorrência de infecção mista por *M. gallisepticum* e *M. synoviae* (MS).

Ainda no Brasil, García et al. (2005) realizou um estudo para detectar a sensibilidade e especificidade analítica e de detecção para *M. gallisepticum* e *M. imitans* (MI) de suabes traqueais usando três grupos de aves expostas às cepas de vacina ts-11 e 6/85. Para isso, foram utilizadas quatro reações genéricas de PCR baseadas nos seguintes genes: 16sRNAr 16s e outros três métodos de PCR recentemente desenvolvidos que fazem a amplificação de regiões de genes de proteínas de superfície, sendo os genes *mgc2*, *LP* e *gapA*. Os métodos de PCR para *mgc2*, *nLP* e *ngapA* apenas amplificaram o DNA de MG, enquanto o rRNA de 16S rRNA amplificou o DNA de MG e MI. A sensibilidade analítica dos quatro métodos genéricos de PCR foram expressos em unidades de mudança de cor (CCU)/reação de amplificação foi estimada para cada método de PCR e variou de 4 a 400 CCU/reação; as sensibilidades dos métodos de PCR simples 16S rRNA e *mgc2* foram estimadas em 40 CCU/reação, o *nLP* em 400 CCU/reação e o *ngapA* em 4 CCU/reação. As PCRs *ngapA*, *IDEXX* e *mgc2* mostraram as melhores razões de sensibilidade para a detecção de cepas de *M. gallisepticum* quando comparadas ao isolamento. Porém, foi observado que, em comparação com os métodos de PCR *ngapA* e *IDEXX*, a PCR para o gene *mgc2* tem um tempo de resposta mais rápido, uma vez que este teste consiste em uma única reação de amplificação e o produto de amplificação é detectado por eletroforese em gel de agarose. Portanto, entre os métodos de PCR avaliados neste estudo, a busca pela amplificação do gene *mgc2* é o método de escolha para aplicação em amostras colhidas de aves a campo.

Buim et al. (2009) no Brasil, fizeram um estudo no qual foram coletadas 1.046 amostras de suabes traqueais provenientes de 33 granjas, incluindo-se aves de postura, matrizes, frangos de corte e de um incubatório. As granjas desse estudo estavam localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, sendo que as aves dos planteis amostrados apresentavam problemas respiratórios, ou queda na produção de ovos. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA e posteriormente à técnica de PCR multiplex específica para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Como resultado, observou-se que 339/1046 (32,4%) foram positivas para MS e 21/1046 (2%) foram positivas para MG. Além disso, observou-se também que,

das 33 granjas investigadas, 11 (33,33%) se mostraram positivas para MS e 3 (9,09) se mostraram positivas para MG.

Além disso, no Brasil, Machado et al. (2012) fizeram um estudo cujo objetivo foi estudar a ocorrência de infecção por MG pela técnica de PCR e correlacionar a positividade nessa técnica à presença de lesões de aerossaculite, à queda de peso das aves ao abate e à condenação de carcaças de lotes de frangos de corte na Inspeção Sanitária Federal. Do total de 40 lotes de frangos de corte abatidos sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, foram selecionados para necropsia, ao acaso e independente do sexo, três frangos por lote, sendo as traquéias coletadas e agrupadas em pool para formação de uma amostra para análise. As traqueias foram abertas e seu conteúdo foi coletado com auxílio de suabes. O DNA das amostras desses suabes foi extraído e submetido à PCR para detecção de MG. Dos 40 lotes analisados pela PCR, 20% (8/40) foram positivos para MG. Além disso, pode-se observar também que a positividade por MG está relacionada à aerossaculite, a qual provoca queda de peso em frangos de corte.

Ainda no Brasil, De Nardi et al. (2013) analisaram amostras de soro sanguíneo de 175 frangos caipiras da cidade de Araguaína, no Estado de Tocantins, sendo que as amostras foram coletadas de quatro granjas avícolas de Araguaína, incluindo três granjas comerciais e uma não comercial, onde as aves eram criadas para consumo próprio. As amostras foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-MG através de testes sorológicos. Como resultado, observou-se que, das 175 amostras de sangue de aves adultas (*Gallus gallus domesticus*), 74(42,29%) apresentaram sorologia positiva para MG.

No trabalho de Barros et al. (2014), no Brasil, o objetivo foi investigar a ocorrência de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) em frangos de corte e poedeiras comerciais no estado de Pernambuco. Fragmentos traqueais foram analisados em 55 frangos de corte saudáveis, 35 frangos de corte com sinais respiratórios e 30 poedeiras comerciais com sinais respiratórios, de 24 granjas avícolas comerciais, sendo cada amostra composta por um pool de cinco aves. Como resultado, observou-se que a análise de PCR revelou oito amostras (33,33%) positivas e 16 (66,67%) negativas para o gênero *Mycoplasma*. Dentre todas as amostras submetidas à nested PCR, sete (29,17%) foram positivas para

MS e apenas uma (4,17%) foi positiva para MG. Ainda, dentre as sete amostras coletadas de frangos de corte com sinais clínicos de doença respiratória, três foram positivas para MS e nenhuma amostra foi positiva para MG, enquanto que entre as seis amostras de galinhas de postura comerciais, quatro foram positivas para MS e uma foi positiva para MG.

Casagrande et al. (2014), no Brasil, acompanharam 10 casos de doença respiratória compatível com micoplasmose em galinhas de subsistência enviadas ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. Durante esse período, buscou-se o mesmo número de aves sem histórico de doença respiratória para serem utilizadas como controles negativos. Nas aves afetadas por problemas respiratórios, foi realizada a caracterização histológica das lesões. Além disso, suabes de seios nasais, de saco aéreo e de saco pericárdico, bem como fragmento de pulmão foram coletados para o posterior diagnóstico de *M. gallisepticum* pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Suabes traqueais também foram coletados e submetidos à técnica de PCR em tempo real para diagnóstico desse mesmo patógeno. Observou-se, como resultados, que as 10 galinhas apresentaram-se positivas para MG pelo método de IHQ, enquanto que, na qPCR, 7 de 10 amostras se mostraram positivas. As três aves nas quais não foi possível a detecção de MG pela técnica de qPCR correspondiam as amostras inclusas em blocos de parafina, devido à indisponibilidade de material congelado.

No estudo de Teixeira et al. (2015) foram colhidas amostras de suabes traqueais de 25 lotes de granjas comerciais de frangos de corte e de amostras de suabes traqueais de 20 lotes de galinhas de postura no estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2013 e 2014. Como resultado, observou-se que nenhuma amostra de suabe traqueal colhido de granjas comerciais de frangos de corte mostrou-se positiva para MG, enquanto que, no caso das amostras colhidas dos lotes de galinhas de postura, a positividade para esse mesmo agente foi de 5%.

Essas bactérias podem diferir de forma significativa nos seus perfis antigênicos e nas propriedades de suas proteínas de superfície que estão relacionadas com sua virulência (Rosengarten et al., 1996; Raviv et al., 2006). O reconhecimento das cepas de MG pode ser feito por métodos sorológicos (Kleven et al., 1988; Rosengarten et al., 1996; Raviv et al., 2006) ou por análise eletroforética

de proteínas celulares (Khan et al., 1987; Raviv et al., 2006). Porém, para testes sorológicos, o hospedeiro precisa de pelo menos uma semana após a infecção para a produção de anticorpos em níveis detectáveis contra essa bactéria (Kaszanyitzky et al., 1994; Hossam et al., 2016). A principal desvantagem nesse caso é que a sorologia pode gerar resultados falsos negativos pelas razões anteriormente expostas e, alternativamente resultados falsos positivos, devido também à possibilidade de ocorrerem reações inespecíficas (Yamamoto et al., 1991; Yoder et al., 1991; Fan et al., 1995; Hossam et al., 2016).

O padrão-ouro para o diagnóstico de MG é o isolamento e a identificação desse microrganismo através do cultivo seguido de confirmação morfológica, bioquímica, sorológica e molecular (Kleven et al., 2008; Hossam et al., 2016). No entanto, as técnicas de cultivo são laboriosas, demoradas, de alto custo e requerem cuidados especiais de manipulação em condições rigorosas de esterilidade e, além disso, as chances de resultados falsos positivos e falsos negativos são possíveis (Fan et al., 1995; Kempf, 1998; Hossam et al., 2016). Como o MG é um microrganismo de crescimento lento em meios de cultura, sua detecção requer uma ou mais semanas para o crescimento da cultura e de maneira que se tenha um diagnóstico definitivo desse agente infeccioso em aves infectadas (Branton et al., 1995; Hossam et al., 2016).

Por conta disso, as técnicas moleculares têm-se revelado mais sensíveis e discriminatórias do que os métodos de isolamento de micoplasmas (Ley, 2003b; Raviv et al., 2006). Para tanto, várias técnicas moleculares foram desenvolvidas para a detecção e a identificação de *M. gallisepticum*, como a análise do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por clivagem com enzimas de restrição (RFLP) (Kleven et al., 1988; Raviv et al., 2006), ribotipagem (Yogev et al., 1988; Raviv et al., 2006), hibridização com sondas de DNA (Khan et al., 1989; Raviv et al., 2006), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Marois et al., 2001; Raviv et al., 2006), reação em cadeia da polimerase (Nascimento et al., 1993; Raviv et al., 2006), polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados (AFLP) (Hong et al., 2005; Raviv et al., 2006) e o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), que foi bastante utilizado (Geary et al., 1994; Fan et al., 1995; Raviv et al., 2006). Além desses, os métodos baseados no sequenciamento de nucleotídeos de determinados genes do *M. gallisepticum* também foram

introduzidos como uma nova abordagem para o estudo da epidemiologia molecular de patógenos bacterianos (Enright et al., 1999; Raviv et al., 2006).

A prevenção da micoplasmose em aves de produção inclui a aquisição de aves livres dessas bactérias e monitoramento constante de plantéis de aves reprodutoras. Esses plantéis de aves livres de MG devem ser mantidos pela manutenção de substituições de fontes isentas de micoplasma em um sistema de criação de lotes de uma única idade, tudo em todos os sistemas (Kleven et al., 2008; Okwara et al., 2016). Ainda, o controle da micoplasmose aviária depende da adoção de medidas mais eficazes de biossegurança e higiene. Embora a introdução de procedimentos terapêuticos possa ser muito útil na prevenção de sinais clínicos e lesões, bem como na redução de perdas econômicas, os antimicrobianos não conseguem eliminar totalmente a infecção por MG de uma granja, não sendo, portanto, uma solução satisfatória a longo prazo (OIE, 2008; Kleven et al., 2008; Okwara et al., 2016). Na verdade, considera-se que o controle da infecção por MG por antimicrobianos é necessário para complementar medidas de segurança e com a finalidade de minimizar perdas econômicas e transmissões horizontais e verticais desse agente infeccioso (Behbahan et al., 2008; Okwara et al., 2016). A prevenção e controle dessa bactéria também incluem vacinação em situações onde a manutenção de plantéis de aves livres de infecção não é viável, e também a utilização de desinfetantes (Okwara et al., 2016).

É importante destacar também a existência de um programa, conhecido como Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que busca definir estratégias de vigilância epidemiológica para as doenças avícolas de controle oficial, destacando entre elas a influenza aviária, doença de Newcastle, salmonelose e micoplasmose, ajudando, dessa forma, a inspecionar melhor os locais onde as granjas de frangos de corte estão localizadas e, dessa forma, diminuir o número de aves mortas ou com sinais clínicos e/ou lesões no trato respiratório decorrentes da infecção por esse agente patogênico.

2.2. Metapneumovírus aviário (AMPV)

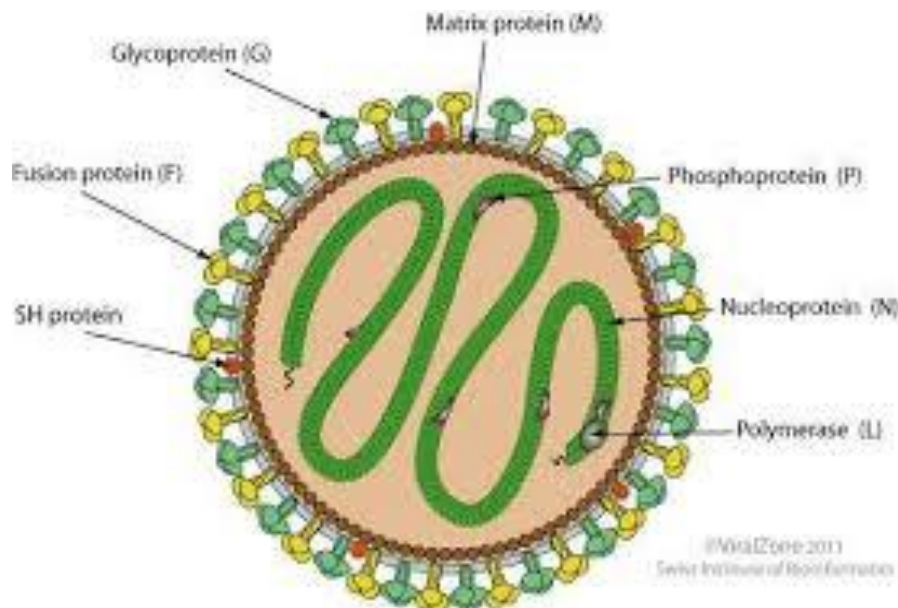
Os metapneumovírus aviários (AMPV), anteriormente referidos como pneumovírus aviários (APV) e vírus da rinotraqueíte de perus (TRT), provoca uma

infecção aguda e altamente contagiosa do trato respiratório superior de perus e de galinhas. Em perus, o vírus causa uma doença infecciosa conhecida como rinotraqueíte de perus (TRT) (OIE, 2008b). Já, em galinhas, o papel da AMPV como um patógeno primário é menos evidente, embora haja vários indícios de que seja um dos fatores envolvidos na etiologia da síndrome da cabeça inchada (swollen head syndrome - SHS), que se caracteriza por uma severa forma de sinusite nas aves acometidas (Cook, 2000). Ainda, deve-se destacar que os perus e as galinhas são as mais suscetíveis à infecção por AMPV e apenas outras duas outras espécies aviárias; faisões e galinha-d'angola foram demonstrados como sendo susceptíveis à infecção por AMPV (Gough et al., 1988, Cook, 2000).

O agente etiológico é um vírus com genoma RNA de cadeia simples, com sentido negativo e não segmentado. Esse genoma apresenta um tamanho de aproximadamente 14 kb contido em um nucleocapsídeo com uma simetria helicoidal e envolto por envelope viral contendo glicoproteínas (Gough, 2003; OIE, 2008b). O AMPV apresenta várias características em comum com os demais pneumovírus, mas com algumas diferenças a nível molecular em relação aos pneumovírus de mamíferos. Devido a isso, foi classificado como a estirpe tipo de um novo gênero, *Metapneumovirus*, na família *Paramyxoviridae* (Pedersen et al., 2000). Outros *Metapneumovirus* foram também detectados em seres humanos e estão associados à infecção do trato respiratório em crianças (Naylor e Jones, 1993; Toquin et al., 2003; Van Den Hoogen et al., 2001; OIE, 2008b). O metapneumovírus aviário não apresenta as proteínas não estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2) e a ordem dos genes no genoma desse vírus é [3'-NPMF-M2-SH-G-L-5'], a qual é diferente da que existe nos pneumovírus de mamíferos (3'-NS1-NS2-NPM-SH-GF-M2-L-5') (Tanaka et al., 1995; OIE, 2008b).

As estirpes de AMPV foram classificadas em quatro subtipos: A, B, C e D com base na análise da sequência de nucleotídeos do gene da glicoproteína G de envelope que é responsável pela ligação ao receptor da membrana da célula alvo do hospedeiro (glicoproteína G) (Bayon-Auboyer et al., 2000; Cook & Cavanagh, 2002; OIE, 2008b). Além disso, o sequenciamento de nucleotídeos do gene codificador da glicoproteína G revelou diferenças moderadas a extensas entre os quatro subtipos atualmente conhecidos do AMPV (Cook e Cavanagh et al, 2002). Dessa forma, supõe-se que possam existir outros subtipos do AMPV, mas que ainda não foram detectados e/ou identificados (OIE, 2008b). Além da glicoproteína G, o AMPV

apresenta outras proteínas estruturais como a glicoproteína de fusão (F), a fosfoproteína (P) e a proteína de nucleocapsídeo (N) e ainda a RNA-polimerase (L).



O primeiro relato da infecção por AMPV foi feito África do Sul e depois na França e no Reino Unido, no início dos anos 80. Após isso, a infecção por este vírus foi descrita em outros países. Embora a maior parte da evidência de ocorrência de infecções por AMPV em aves provenha de estudos sorológicos e não de isolamento viral, a pneumovirose aviária tem sido relatada em toda a Europa e em Israel, Marrocos, Zimbábue, Taiwan, Japão, Brasil, América Central e EUA (Jones, 1996). Os únicos dois países que afirmam estarem livres de infecção por AMPV são a Austrália e o Canadá, apesar de que não há dados disponíveis sobre a ocorrência de infecção por AMPV em algumas áreas geográficas, (Bell e Alexander, 1990) incluindo o Canadá (Heckert e Myers, 1993; Cook, 2000).

Gharaibeh et al. (2007) fizeram um estudo na Jordânia para investigar o papel do AMPV na etiologia de doença respiratória de frangos por métodos sorológicos e moleculares. Nesse estudo, foram analisados 31 granjas de frangos e 7 lotes de matrizes de frangos de corte por ELISA competitivo e 150 granjas de frangos e 7 lotes de matrizes de frangos de corte foram examinados por PCR de transcrição reversa. Como resultado, foram detectados anticorpos contra AMPV em 11 dos 31 granjas de frango analisados pelo ELISA. Todas as 7 amostras (100%) de lotes de matrizes de frangos de corte foram positivas para a presença de anticorpos anti-

AMPV pelo teste de ELISA. Já dos 150 lotes de frangos analisados por RT-PCR, 20 se mostraram positivos para AMPV, enquanto que nenhum dos lotes de matrizes de frangos de corte testados foi positivo. Ademais, todos os 20 isolados de AMPV detectados foram subtipo B.

Roussan et al. (2008) fizeram também um estudo na Jordânia para avaliar a prevalência de alguns patógenos respiratórios aviários. Foram testados suabes de traqueia de 115 planteis de frangos de corte comerciais que sofreram doença respiratória para o subtipo de influenza aviária A9 H9N2 (AIV), vírus da bronquite infecciosa aviária (VBI), vírus da doença de Newcastle (NDV) e metapneumovírus aviário (AMPV), usando-se as técnicas de RT-PCR e para o *Mycoplasma gallisepticum* (MG), usando-se a técnica convencional de PCR. Os resultados de PCR e RT-PCR mostraram que 13 e 14,8% destes planteis estavam infectados com NDV e IBV, respectivamente, enquanto que 5,2%, 6,0%, 9,6%, 10,4%, 11,3% e 15,7% destes planteis estavam infectados com NDV e MG; MG e AMPV; VBI e NDV; VBI e MG; NDV e AIV; e VBI e AIV, respectivamente. Além disso, 2,6% desses planteis de aves estavam infectados com VBI, NDV e AMPV ao mesmo tempo. Por outro lado, 11,3% desses lotes revelaram-se negativos para todos os agentes infecciosos acima mencionados.

No Brasil, o primeiro isolamento do AMPV foi realizado em criações de matrizes nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (Arns e Hafez, 1995). O sequenciamento do gene da glicoproteína G foi realizado em dois isolados de matrizes, sendo identificados como subtipo A e possuindo uma similaridade de 99% na sequência de aminoácidos da sua proteína G com o subtipo A europeu. (Dani et al., 1999).

Além disso, Boaro et al. (2004), no Brasil, fizeram um estudo para avaliar a soroprevalência de metapneumovírus aviário em frangos de corte no Planalto Médio do Rio Grande do Sul e encontraram amostras positivas em 5 (10,4%) dos 48 lotes analisados provenientes de 5 (21,74%) municípios distintos. Já Peres et al. (2006) conduziram um estudo no Brasil para avaliar a soroprevalência de infecção por metapneumovírus aviário em lotes de frango de corte em municípios de Mato Grosso do Sul e detectaram 98/536 (18,3%) amostras positivas para presença de anticorpos contra AMPV e em um total de 49/54 lotes analisados (90,7%) foram caracterizados como positivos ou suspeitos.

Chacón et al. (2007) realizaram um estudo no Brasil no qual, no período entre os meses de setembro e novembro de 2005, foram observados sinais respiratórios caracterizados por rinite, sinusite, tosse e diminuição da produção de ovos em aves de três granjas de produção no Estado de São Paulo, Brasil. Os três lotes de aves desse estudo nunca haviam sido vacinados contra AMPV. Foram coletadas amostras de tecidos da traquéia, pulmões e seios nasais, as quais foram submetidas à extração de RNA, RT-PCR e sequenciamento. Como resultado principal desse estudo, observou-se que a nested RT-PCR amplificou um fragmento de 361 pb nas três granjas, tamanho este compatível de um produto do gene G do subtipo B de AMPV. A análise de sequência de nucleotídeos do gene G confirmou os resultados do subtipo B do AMPV pela técnica de RT-nPCR. As sequências das três estirpes obtidas de lotes de aves não vacinadas e foram alinhadas com as sequências de AMPV-B previamente publicadas, confirmando-se tratarem-se de amostras do subtipo B do AMPV.

Um outro trabalho de Chacón et al. (2011) trouxe ainda mais informações relevantes sobre a ocorrência de infecção pelo AMPV em planteis avícolas do Brasil. Nesse trabalho, o metapneumovírus aviário (AMPV) foi detectado por técnicas moleculares (RT-PCR) em granjas de frangos, galinhas, reprodutoras e perus de seis regiões geográficas diferentes do Brasil. Os vírus detectados foram subtipados e apenas os subtipos A e B foram detectados em granjas, tanto vacinadas como não vacinadas. Estes resultados demonstram a cocirculação dos subtipos A e B nas granjas avícolas comerciais brasileiras. Além disso, os resultados desse trabalho mostram o fracasso dos atuais programas de vacinação no Brasil, pois, apesar do uso de diferentes programas de vacinação, incluindo vacinas vivas e inativadas com os subtipos A e B do AMPV, foram observadas doenças respiratórias, diminuição da produção de ovos e alta taxa de soro-conversão em planteis avícolas vacinados. Por conta disso, foram levantadas hipóteses de falhas durante a vacinação, ou a curta duração da imunidade pós-vacinal, ou ainda a infecção por um subtipo diferente da estirpe da vacina (que poderia evitar a imunidade conferida contra as estirpes da vacina) para explicar a persistência do vírus.

Ainda, no Brasil, o trabalho de Fellipe et al. (2011) teve como objetivo principal detectar a presença de AMPV em aves silvestres e sinantrópicas do Brasil e em aves comerciais de várias regiões do Brasil por meio de técnicas de diagnóstico molecular. Para isso, foram colhidas amostras de aves silvestres,

pombos selvagens e frangos comerciais. Como resultado, observou-se amostras positivas para os subtipos A e B de AMPV em sete (13,2%) diferentes aves silvestres e em 50% dos pombos assintomáticos que haviam sido recebidos no Zoológico Bosque dos Jequitibás, Brasil. Além disso, foram observados como resultados 15 (12,9%) amostras positivas de frangos domésticos com síndrome da cabeça inchada de várias regiões do Brasil.

O diagnóstico de confirmação de infecções por AMPV tanto em perus como em galinhas pode ser feito por técnicas moleculares ou sorológicas. Dentre essas últimas técnicas, destaca-se o teste de soroneutralização (SN), o qual demonstra uma sensibilidade semelhante ao método de ELISA (Baxter-Jones et al., 1989; Cook, 2000), sendo, porém, esse último é o método sorológico mais utilizado (Grant et al., 1987, Chettle e Wyeth, 1988, O'loan et al., 1989; Eterradossi et al., 1995; Cook, 2000).

Como métodos de diagnóstico molecular, destaca-se a PCR que é antecedida pela reação de transcrição reversa (RT-PCR) a qual tem-se mostrado significativamente mais sensível e rápida para a detecção de AMPV do que os métodos de isolamento de vírus devido à natureza fastidiosa de AMPV para propagação em cultivos celulares ou em ovos embrionados (Cook e Cavanagh, 2002; Gough, 2003; OIE, 2008b). Os procedimentos de RT-PCR podem ser dirigidos aos genes F, M, N e G e utilizados para a detecção de AMPV, sendo que alguns desses procedimentos são subtipos específicos, enquanto que outros não e servem para a detecção universal de AMPV (Bäyon-Auboyer et al., 1999; Pedersen et al., 2000; Pedersen et al., 2001, OIE, 2008b). Os ensaios específicos de subtipos são utilizados com sucesso na detecção e diagnóstico de estirpes endêmicas (Bäyon-Auboyer et al., 2000; Pedersen et al., 2001; Cook & Cavanagh, 2002; Mase et al., 2003; OIE, 2008b).

Como procedimentos para o controle da infecção por AMPV, destacam-se boas práticas de gestão e boa biossegurança as quais são importantes para ajudar a prevenir a infecção e minimizar os seus efeitos lesivos. Embora as infecções por AMPV não possam ser tratadas, os antibióticos são usados para controlar as infecções bacterianas secundárias que se desenvolvem após a infecção pelo AMPV (Stuart, 1989; Hafez et al., 1990). Deve-se considerar também que vacinas de qualidade estão disponíveis e as infecções por AMPV podem ser prevenidas por

vacinação (Giraud et al., 1987; Buys et al., 1989; Cook et al., 1989; Williams et al., 1991).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de infecção por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e pelos subtipos A ou B de Metapneumovírus aviário (AMPV) em frangos de corte oriundos de planteis avícolas comerciais das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil.

3.2. Objetivos Específicos

- Detectar a presença de *Mycoplasma gallisepticum* em amostras de suabes traqueais e nasais de frangos de corte, por meio da técnica de PCR convencional;
- Detectar a presença de Metapneumovírus Aviário em amostras de suabes nasais e traqueais de aves de produção, por meio da técnica de RT-Nested-PCR;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estirpes de Referência

Para a análise molecular de MG foi usada a estirpe vacinal atenuada de *M. gallisepticum* (Merck Sharp & Dohme – MSD, São Paulo, Brasil). Já, para análise molecular de AMPV, foram usadas como controle positivo a estirpe vacinal atenuada RTV8544 (Nobilis RTV8544; Laboratório Intervet, São Paulo, Brasil) e a estirpe vacinal atenuada PL21 (Nemovac; Laboratório Merial, São Paulo, Brasil), classificadas nos subtipos A e B do AMPV, respectivamente.

4.2. Espécies amostradas, área de estudo e colheita das amostras

As colheitas de suabes nasais e traqueais foram realizadas, entre 2017 e 2018, em frangos de corte com sinais clínicos e lesões do trato respiratório de 87 lotes oriundos de 15 granjas avícolas comerciais de frango de corte das regiões Sudeste (Estados de São Paulo e de Minas Gerais) e Centro-Oeste (Estados de Mato Grosso e Goiás) do Brasil, nas quais não eram usadas vacinas contra MG, nem contra AMPV (Tabela 1 do Anexo). Para tanto, foram colhidas 10 amostras de suabes de cada um dos lotes investigados diretamente da granja na qual as aves residiam. Após a colheita, foram reunidos em um único pool 10 suabes para cada lote amostrado e, em seguida esses pools de 10 suabes foram acondicionadas em meio mínimo de Eagle (MEM) ou caldo triptose fosfato (TPB) e armazenados a -80°C, para posterior extração do DNA bacteriano e do RNA viral.

4.3. Extração de DNA para a análise molecular de *Mycoplasma gallisepticum* das amostras de suabes nasais e traqueais

O DNA do controle positivo da PCR para MG e aqueles provenientes das amostras de suabes foram extraídos utilizando o QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN, conforme instruções do fabricante. Ao final, as amostras de DNA foram devidamente identificadas e lidas quanto à absorbância em espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo

Scientific) nos comprimentos de onda de 230nm, 260nm e 289nm. Após isso, as amostras tiveram suas relações 260/280 e 260/230, bem como as suas concentrações, determinadas. Após isso, foram armazenadas a -20°C para os posteriores ensaios de PCR.d

4.4. Extração de RNA para a análise molecular de Metapneumovírus Aviário das amostras de suabes nasais e traqueais

O RNA dos controles positivos para os subtipos A e B do AMPV e aqueles das amostras de suabes nasais foram extraídos utilizando-se protocolo de extração de RNA por Trizol, conforme o protocolo descrito pelo fabricante (Invitrogen, USA). Ao final, as amostras de RNA extraído foram devidamente identificadas e lidas quanto à absorbância em espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 230nm, 260nm e 289nm as relações 260/280 e 260/230, bem como as suas concentrações, fossem determinadas e, em seguida, foram imediatamente submetidos à técnica de transcrição reversa (RT).

4.5. Detecção molecular de *M. gallisepticum* e metapneumovírus aviário.

4.5.1. Primers utilizados na Detecção molecular de *M. gallisepticum* e metapneumovírus aviário.

Oligonucleotídeo	Sequência	Gene	Posição na Sequência	Referência	Tam Do Fragto
G1+	GGGACAAGTATC T/C C/A T/G AT	G	1 a 17	Juhasz & Easton (1994)	444p
G6-	CTGACAAATTGGTCCTGATT	G	422 a 441	Juhasz & Easton (1994)	444p
G5-	CAAAGA A/G CCAATAAGCCCA	G	401 a 419	Juhasz & Easton (1994)	268pb
G8+A	CACTCACTGTTAGCGTCATA	G	152 a 171	Juhasz & Easton (1994)	268pb
G5-	CAAAGA A/G CCAATAAGCCCA	G	401 a	Juhasz & Easton (1994)	361pb

			419		
G9-B	TAGTCCTCAAGCAAGTCCTC	G	68 a 87	Juhasz & Easton (1994)	361pb
mgc2 2F	CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA	Mgc2	637 a 661	García et al. (2005)	211pb
mgc2 2R	TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTC	Mgc2	912 a 937	García et al.(2005)	211pb

4.5.2. PCR convencional para *M. gallisepticum* dirigida ao gene *mgc2*

A técnica de PCR convencional e os oligonucleotídeos iniciadores usados na detecção do MG foram baseados nas recomendações de Garcia et al. (2005). Dessa forma, os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados neste estudo para a detecção de MG são específicos para uma sequência do gene *mgc2*, e amplificam na PCR um fragmento de 211 pb (García et al., 2005). A mistura para a realização da técnica convencional de PCR para a detecção do gene *mgc2* de MG foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão da TaqPolimerase 10x concentrado, 0,5 µL de TaqPolimerase (5U/µL), 1 µL de DNTPs a 400mM, 0,75 µL de MgCl₂, 16,75 µL de água livre de nuclease (Promega Corp.), 0,5 µL (25 pmol/µL) de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 5 µL do DNA molde extraído das amostras biológicas que foram analisadas. Foram utilizadas as seguintes condições para a realização dessa PCR: um primeiro ciclo de 5 min a 94 °C, seguido de mais 35 ciclos compreendendo incubação a 94°C por 1 min, 58°C durante 1 min e depois 72°C durante 2 min, seguindo-se de mais um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min. A cepa vacinal do *M. gallisepticum* 6/85 (Merck Sharp & Dohme - MSD) foi usada como controle positivo para extração de DNA, que foi usado como *template* para a PCR. Além disso, um controle negativo constituído por água livre de nucleases também foi usado em cada PCR.

4.5.3. Nested-RT-PCR para a Detecção e a Identificação dos Subtipos A e B do Metapneumovírus Aviário

As preparações de RNA extraído das amostras de suabes nasais colhidas de frangos de corte foram submetidas à técnica de Nested-RT-PCR, usando os

oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Juhasz & Easton (1994) e a metodologia descrita por Cavanagh et al. (1999), a fim de detectar e diferenciar os subtipos A e B do AMPV. A preparação da mistura da RT se deu da seguinte maneira: primeiramente, juntou-se em um volume final de 5 μ L, 1 μ L de random primer e 4 μ L de água DEPC, adicionando 5 μ L da amostra de RNA extraída. O conjunto de ciclos da RT compreendia inicialmente uma fase de incubação a 70°C por 5 min, seguida de outra incubação a 4°C por 1 min. Após isso, um segundo passo era feito para que a transcrição fosse realizada. Nesse passo, o mix da reação foi constituído por: 5 μ L de tampão (Buffer 5x), 1,25 μ L de DNTPs (100mM), 1 μ L de RNase OUT, 1 μ L da enzima M-MMLV e 6,75 μ L de água DEPC, totalizando um volume de 15 μ L, sendo a esse volume adicionado 10 μ L do produto advindo da primeira fase da reação, descrita acima. A incubação dessa segunda fase da RT compreendeu uma primeira etapa a 37°C por 60 min, seguida de outra etapa a 38°C por 10 min e, depois foi mantida a 4°C. A mistura da PCR principal era preparada em um volume final de 25 μ L contendo 2,5 μ L de tampão 10x concentrado, 0,25 μ L de Taq DNA Polimerase (5U/ μ L) (Invitrogen), 0,5 μ L de DNTPs a 400mM, 0,75 μ L de MgCl₂, 16,5 μ L de água livre de nuclease (Invitrogen), 1 μ L (10 pmol/ μ L) de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 5 μ L do cDNA molde extraído das amostras biológicas que foram analisadas. A segunda PCR (Nested-RT-PCR) foi realizada separadamente com os pares de oligonucleotídeos iniciadores internos à sequência de DNA amplificado na primeira PCR e de maneira a amplificar duas regiões do gene G do AMPV; uma delas com 268 pb e a outra com 361 pb, que, respectivamente, correspondem aos subtipos A ou B desse vírus. Preparações de cDNA obtidas na RT de RNAs extraídos de amostras das estirpes vacinais RTV (Nobilis RTV 8544, Merck Sharp and Dohme - MSD) e PL21 (Nemovac, MERIAL) foram usadas como controles positivos para os subtipos A e B do AMPV. Além disso, um controle negativo constituído por água livre de nucleases também foi usado em cada protocolo da técnica de Nested-PCR.

4.6. Eletroforese em Gel de Agarose

Após as reações de PCR e RT-PCR, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose para confirmar o tamanho dos fragmentos

obtidos nas ampliações de maneira a comprovar a especificidade do produto amplificado gerado. Para tanto, foram adicionados 2µL de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10mM e pH 7,8; EDTA 1M e pH 8,0] em 5µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal, em tensão de 60V por aproximadamente duas horas, em gel de agarose a 1,5% de concentração em tampão TEB 0,5X (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) e com SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen™) (10.000X concentrate in DMSO). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador “100bp DNA Ladder” (Invitrogen) para eletroforese dos produtos de PCR. Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene), foto-documentados com uma câmera digital (Synoptics) e processados por meio do software Gene Link (Syngene).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 87 lotes de amostras de suabes traqueais e nasais analisadas, dois (2/87 = 2,3%) mostraram-se positivos para a presença de *Mycoplasma gallisepticum*, como o que pode ser observado na **Figura 1** (abaixo), no qual a primeira canaleta demonstra o marcador molecular utilizado, seguida da canaleta 2, que apresenta um controle positivo. Na canaleta 3 pode-se observar uma amostra negativa (ausência de banda), enquanto que as canaletas 4 e 5 apresentam amostras positivas para esse agente infeccioso, o que pode ser confirmado pelo fato das bandas do produto amplificado dessas amostras estarem na mesma altura da banda do produto

amplificado para o controle positivo de MG. A canaleta 6 é um controle negativo, o qual, no lugar da amostra, água ultra-pura é utilizada. O tamanho dos produtos amplificados pela reação de PCR para o gene *mgc2* para a detecção de MG podem variar de 236pb a 302pb (García et al. 2005)

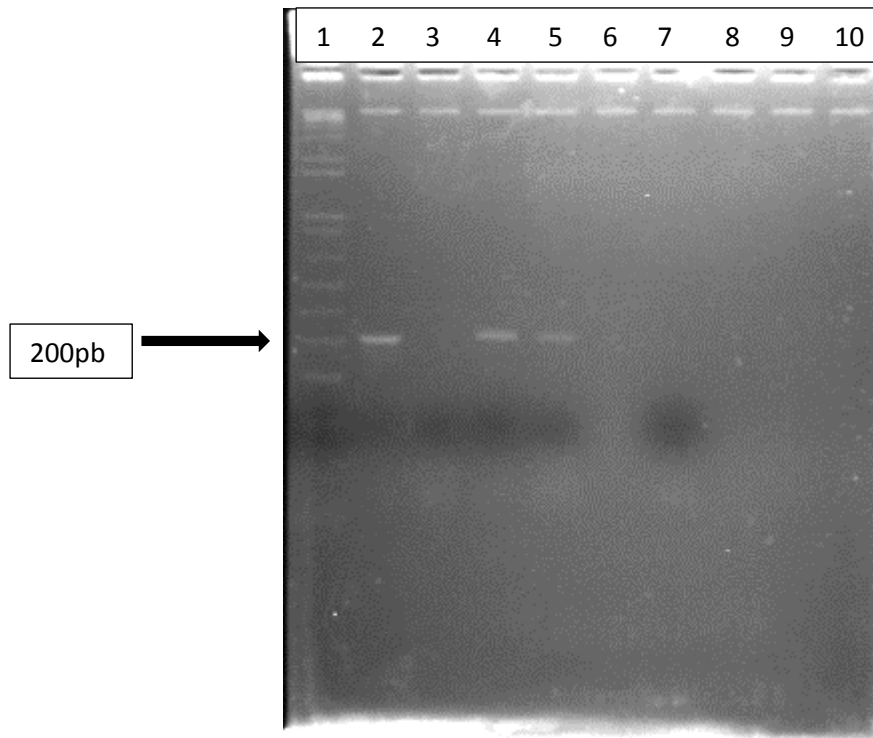


Figura 1. Eletroferograma de gel de agarose a 1,5% como resultado da amplificação por PCR do gene *mgc2* de *M. gallisepticum* em amostras de suabes traqueais de frangos de corte. Canaleta 1: marcador molecular 1 kb DNA plus ladder. Canaleta 2: controle positivo. Canaleta 3: amostra negativa. Canaletas 4 e 5: amostras positivas. Canaleta 6: controle negativo.

Deve-se destacar que as duas amostras detectadas como positivas para MG foram provenientes de dois lotes (1 e 2) de uma criação de frangos de corte com 23 dias de idade (Granja D) situada na região Sudeste do Brasil.

No entanto, dos 87 lotes de amostras de suabes traqueais e nasais analisadas, nenhuma delas revelou positividade para a presença do metapneumovírus aviário, tanto para o subtipo A, quanto para o subtipo B desse patógeno. Apesar disso, é necessário destacar nesse caso que, em todas as análises realizadas, foram observados produtos amplificados com 268pb e 361pb nos controles positivos, respectivamente para os subtipos A e B do AMPV usados na presente análise (**Figura 2 e 3**).

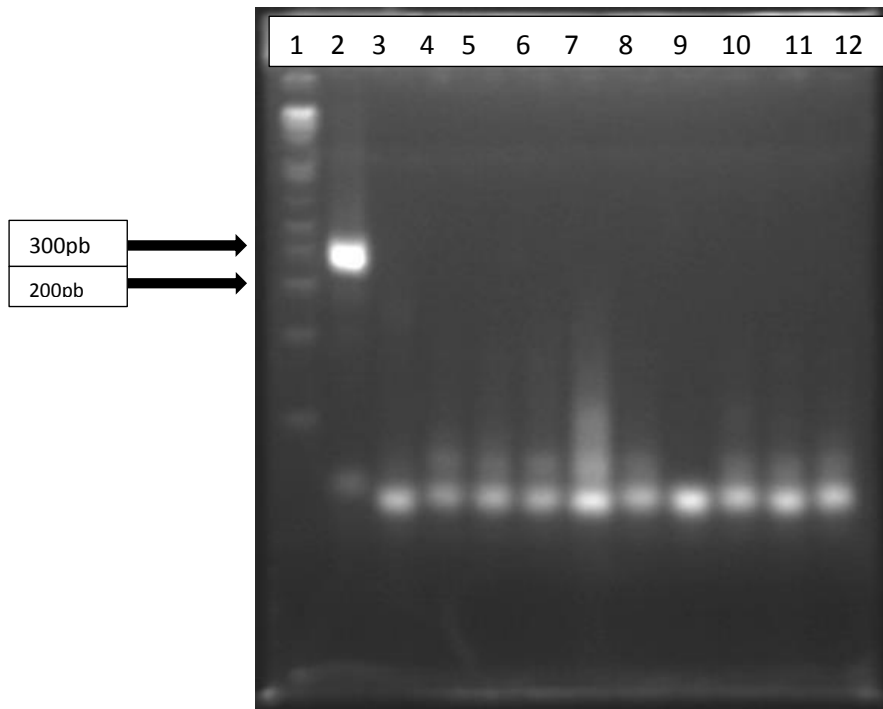


Figura 2. Eletroferograma de gel de agarose a 1,5% como resultado da PCR aplicada em amostras de suabes traqueais e nasais de frangos de corte, para pesquisa do subtipo A do Metapneumovírus aviário (236 pb). Canaleta 1: marcador molecular 1 kb DNA plus ladder. Canaleta 2: controle positivo. Canaletas de 3 a 11: amostras negativas. Canaleta 12: controle negativo.

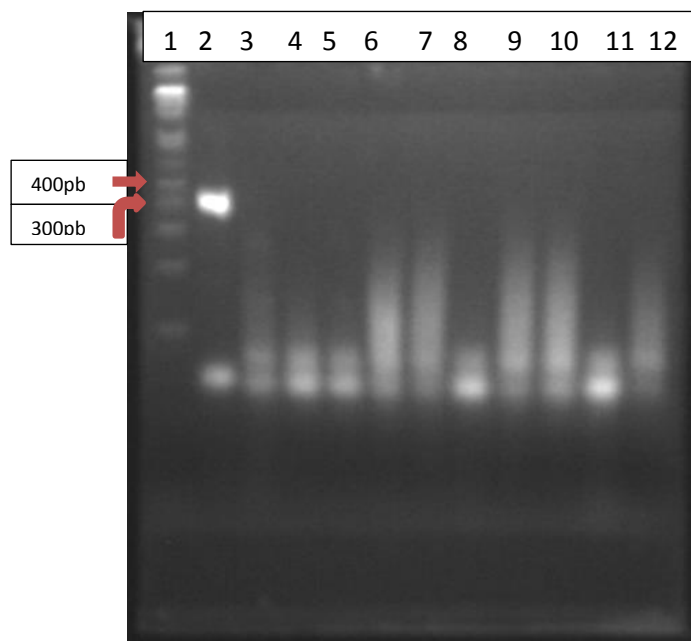


Figura 3. Eletroferograma de gel de agarose a 1,5% como resultado da PCR aplicada em amostras de suabes traqueais e nasais de frangos de corte, para pesquisa do subtipo B do

Metapneumovírus aviário (361 pb). Canaleta 1: marcador molecular 1 kb DNA plus ladder. Canaleta 2: controle positivo. Canaletas de 3 a 11: amostras negativas. Canaleta 12: controle negativo.

Verifica-se que a ocorrência de MG observada neste estudo é bem menor do que a encontrada por Kempf et al. (1993), na França, o qual mostrou que a cultura de MG revelou resultados positivos para 49 das 73 amostras analisadas, enquanto que a PCR detectou 70 amostras positivas dentre 72 testadas, demonstrando que a maior percentagem de amostras positivas foi obtida por PCR e hibridização (mais de 97%) em comparação com a cultura de MG (67%). Ademais, no trabalho de Osman et al. (2008), realizado no Egito, foram coletados 279 amostras de suabes traqueais, das quais 131 foram positivas na PCR. Já, os testes de soro-aglutinação (SAR) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) detectaram anticorpos em 69,9% (320/458) e 58,3% (267/458) das amostras de frango e 48,7% (146/300) e 60,0 (180/300) das amostras de pintinhos, respectivamente. Dessa forma, constata-se que a ocorrência de infecção pelo MG encontrado no presente estudo também se mostrou bem menor do que as encontradas por Hossam et al. (2016), que relataram que a detecção direta de MG pela técnica de PCR revelou positividade para MG em 65,45% das amostras analisadas nesse estudo do Egito.

Quando se considera o Brasil, verifica-se que a percentagem de ocorrência encontrada no presente estudo para MG mostrou-se um pouco menor do que a encontrada por Buim et al. (2009) em uma investigação epidemiológica que foi realizada usando-se a técnica de PCR com um outro par de oligonucleotídeos iniciadores e na qual foram coletadas, entre os anos de 2001 e 2004, 129 amostras de suabe traqueal provenientes de frangos de corte oriundos de granjas localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, tendo-se encontrado 3,8% de positividade (5/129). Ainda, dentro dessa mesma investigação observa-se que a percentagem de positividade encontrada para a presença de MG no conjunto de todas as aves amostradas de granjas comerciais (frangos de corte, galinhas de postura e reprodutoras), foi de cerca de 2% (21/1046), a qual é muito próxima a percentagem de positividade que foi encontrada no presente estudo.

Em adição a isso, deve-se destacar que Teixeira et al. (2015) não encontraram nenhum resultado positivo na técnica de PCR para a presença de MG em amostras de suabes traqueais colhidas de 25 lotes de granjas comerciais de

frangos de corte no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2013 a 2014, tendo sido encontrado, no entanto, nesse mesmo estudo, 5% de positividade para MG nas amostras de suabes traqueais colhidos de 20 lotes de galinhas de postura desse mesmo Estado e durante o mesmo período referido anteriormente.

Entretanto, essa baixa percentagem de positividade para a presença de MG que foi obtida na presente pesquisa para criações de frangos de corte, revela-se ainda bem menor do que as percentagens encontradas em outros trabalhos realizados no Brasil em períodos anteriores. Nesse sentido, verifica-se que a prevalência de MG no estudo realizado por Minharro et al. (2001), utilizando a técnica de PCR, foi de 32,25%, no qual foram analisadas 139 amostras obtidas de frangos de corte, no momento do abate em frigorífico sob Inspeção Federal no Estado de Goiás.

Além disso, Machado et al. (2012) fizeram um estudo para determinar a ocorrência de infecção por MG pela técnica de PCR em amostras de suabes traqueais colhidas em 2012 de 40 lotes de frangos de corte no momento do abate em estabelecimento sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, e os resultados demonstraram que 20% (8/40) dos lotes amostrados nesse Estado foram positivos para a presença de MG.

Ainda, no trabalho de De Nardi et al. (2013), no Brasil, foram analisadas para a detecção de anticorpos anti-MG amostras de soro de 175 frangos caipiras mantidos em 4 granjas na cidade de Araguaína, do Estado de Tocantins, sendo observado que, das 175 amostras de soro de aves adultas (*Gallus gallus domesticus*), 74(42,29%) apresentaram sorologia positiva para MG.

Ainda, deve ser salientado que no trabalho de Barros et al. (2014), foi investigada a presença de MG e MS, pela técnica de Nested-PCR em frangos de corte e poedeiras comerciais, incluindo aves saudáveis e outras com problemas respiratórios que eram criadas em granjas situadas no estado de Pernambuco, tendo-se obtido sete (29,17%) positivas para MS e apenas uma (4,17%) foi positiva para MG. Esses últimos resultados juntamente com os de Teixeira et al. (2015) e os nossos próprios resultados destacam a baixa ocorrência de MG no Brasil em períodos mais recentes e reforçam os nossos achados, sobretudo quando se faz a busca por meio da tentativa de detecção direta do agente por técnicas de diagnóstico molecular como a PCR.

Por outro lado, pode-se considerar que a baixa incidência de MG em aves de corte advindas de planteis avícolas localizados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, observadas no estudo em apreço, pode ser decorrente de uma melhora no monitoramento constante e mais eficaz adotado pela maioria das granjas de frangos de corte que foram investigadas em nosso estudo, bem como pela adoção de medidas mais efetivas de biossegurança e higiene destinadas ao controle desse agente infeccioso nessas mesmas granjas.

Em relação ao Metapneumovírus aviário, foram realizados, há cerca de oito anos atrás, alguns estudos no Brasil utilizando protocolos e primers diferentes daqueles usados em nosso estudo para a realização da técnica de RT-Nested-PCR. Por exemplo, no trabalho feito por Chacón et al. (2011), foram analisadas amostras advindas de frangos e perus comerciais vacinados e não vacinados de 226 granjas diferentes, sendo que as aves amostradas apresentavam distúrbios respiratórios e reprodutivos. Como resultado, observou-se que os subtipos A e B de AMPV foram encontrados em granjas de frangos de corte, em granjas de reprodutoras e em granjas de perus de seis diferentes regiões geográficas do Brasil, sendo que o subtipo A foi encontrado em 15 dessas granjas, enquanto que o subtipo B foi encontrado em 23 das granjas investigadas.

Já, o estudo de Felliipe et al. (2011) teve como objetivo principal detectar a presença de AMPV em aves silvestres e sinantrópicas do Brasil. Para isso, foram colhidas amostras de aves silvestres, pombos selvagens e também de granjas de frangos comerciais de várias regiões do Brasil. Os principais resultados demonstraram amostras positivas para os subtipos A e B de AMPV em sete (13,2%) diferentes aves silvestres e pombos assintomáticos (50%) que haviam sido recebidos no Zoológico Bosque dos Jequitibás de Campinas - SP, além de terem sido detectadas 15 (12,9%) amostras positivas de frangos domésticos com síndrome da cabeça inchada de várias regiões do Brasil.

Em vista do exposto nos dois parágrafos acima, deve-se destacar que a ausência de detecção de AMPV em aves de corte advindas de planteis avícolas localizados nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil observada no estudo em apreço pode ser associada a um maior aprimoramento do processo de controle da infecção pelo AMPV nas granjas de frango de corte amostradas em relação ao período em que os trabalhos anteriores foram realizados, sobretudo, quando se

considera que as amostras do presente estudo foram colhidas entre os anos de 2017 e 2018, para, posteriormente, serem analisadas.

Além disso, uma outra possibilidade para esses nossos achados é o fato de que existe uma grande dificuldade em se detectar a presença de AMPV em frangos após o final da fase mais aguda da infecção. E, ainda, uma outra justificativa que pode ser aqui abordada é o fato de que as manifestações clínicas respiratórias nas aves amostradas nesse estudo podem ter uma etiologia por outros agentes infecciosos bacterianos e/ou virais que também podem afetar frangos de corte, como é o caso do Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), de estirpes de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), dentre outros agentes.

Deve-se destacar também que esses nossos achados podem ser consequência positiva da aplicação continuada do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), o qual busca definir estratégias de vigilância epidemiológica para alcançar um melhor controle das doenças avícolas de controle oficial, destacando entre elas a influenza aviária, a doença de Newcastle, a salmonelose e a micoplasmose aviária.

Diante desses nossos resultados e das explicações levantadas anteriormente, poderia ser buscada uma outra explicação para a ausência de detecção do AMPV e para a reduzida ocorrência de MG encontrada no presente estudo, no sentido de que os sinais clínicos respiratórios, bem como lesões do trato respiratório presentes nas aves amostradas em nosso estudo, podem também estar associados a fatores abióticos, ou seja, a fatores físico/químicos ambientais. Neste contexto, é reconhecido que uma alta concentração de amônia no ambiente interno da granja onde as aves doentes estão sendo criadas pode ser responsável por causar vários problemas respiratórios. Este composto pode ser considerado ainda como um dos responsáveis pelo subdesenvolvimento das carcaças, gerando enormes prejuízos do produtor, pois leva à diminuição do desenvolvimento do animal, bem como à diminuição da produção de ovos (PNSA, 2003).

O efeito da amônia sobre a sanidade das aves é bem conhecido, sobretudo em razão de que as aves não possuem um sistema respiratório com diafragma, e para expelir corpos estranhos inalados, elas necessitam de pequenos cílios presentes em parte de suas vias respiratórias, os quais ajudam a reter e expulsar corpos estranhos. Quando os níveis de amônia atingem 25 ppm (partes por milhão) uma parcela destes cílios são paralisados, não promovendo a retirada de material da traquéia. Com 50

ppm, a amônia já é capaz de destruir alguns cílios, desencadeando uma série de enfermidades respiratórias no organismo das aves (PNSA, 2003).

Para tanto, é necessário manter os níveis de amônia baixos, para evitar sinais clínicos respiratórios e deposição de carcaças, o que acarreta em grandes perdas econômicas. Para isso, é necessário o tratamento das camas de aviários e a utilização de sistemas de ventilação adequados (PNSA, 2003). Assim, destaca-se que o manejo da cama é a chave para evitar problemas com a amônia, já que a formação desta requer três condições nos aviários: 1) dejetos, 2) calor, 3) umidade. Provavelmente, o mais importante destes fatores, dentro do manejo de cama, seja o controle de umidade (PNSA, 2003).

Além disso, produtos para o tratamento das camas como os PLTs (Poultry Litter Treatment), têm-se mostrado efetivos e estão sendo bastante recomendados e adotados por criadores, visto que agem como agentes neutralizantes do crescimento microbiano e da elevação de produção dos gases tóxicos. Porém, a umidade continua sendo a chave para o sucesso deste tratamento. Entretanto, mesmo com a utilização de produtos para o controle de amônia, um mínimo de ventilação deve ser cuidadosamente mantido para remover uma parte da umidade dos aviários. Se a ventilação for reduzida abaixo da recomendada, a umidade aumentará dentro do galpão e na forração, o que promoverá uma aceleração nas reações químicas, eliminando rapidamente o produto controlador de amônia (PNSA, 2003).

O controle da ventilação é um outro fator importante para se manter a umidade e a amônia abaixo dos limites críticos. Com cama nova, na maioria dos galpões, recomenda-se um tempo de ventilação da ordem de 45 segundos a cada 5 minutos. Se a cama for usada, este valor sobe para um minuto (PNSA, 2003). Em camas reutilizadas, para se minimizar o problema da amônia o importante é manejá-la, imediatamente após o desalojamento das aves. No caso de não ser possível a remoção ou a compostagem da cama, durante o vazio sanitário, os torrões maiores devem ser removidos e as cortinas do aviário devem ficar fechadas, de forma a manter um a temperatura favorável ao desprendimento da amônia. Quanto mais amônia for emitida neste período menor será a concentração quando as aves forem alojadas. Ainda, a ventilação deve ser utilizada somente o tempo necessário para evitar a condensação dentro do aviário. Não deixe para efetuar estes procedimentos nas vésperas do alojamento (PNSA, 2003). Outro método para um controle mais eficaz dos

níveis de amônia é a utilização de agitadores de ar dentro dos aviários os quais atuam no sentido de promoverem a movimentação e a geração de uma diferença de pressão entre o exterior e o interior do aviário. Este sistema é aplicado apenas em galpões fechados, onde não há ventilação tipo túnel e em casos em que não é recomendável o insulamento do ar externo direto sobre as aves (PNSA, 2003).

De qualquer sorte, a qualidade do ar no ambiente das granjas investigadas no presente estudo, sobretudo os níveis de amônia devem ser estudados, pois os nossos resultados levam a fazer inferências sobre o possível papel desse fator nos problemas respiratórios que acometiam as aves que foram objeto do presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que atualmente há baixa ou nenhuma ocorrência de MG ou AMPV, respectivamente, nas criações de frangos de corte de granjas investigadas das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, as quais podem ser devidas à utilização de medidas mais efetivas para o controle sanitário desses agentes nas granjas comerciais de frangos de corte amostradas, que de fato têm um maior nível de tecnificação no conjunto de seu manejo, resultando em uma prevenção mais eficaz de uma parte relevante de doenças infecciosas em frangos de corte, como as que têm como agentes o MG e o AMPV.

Ainda, estes achados indicam também, entretanto, que outros agentes infecciosos bacterianos e virais, não investigados neste estudo, podem estar envolvidos na etiologia dos problemas respiratórios dessas aves, já que aquelas que

foram amostradas no estudo em apreço apresentavam sinais clínicos de doenças respiratórias, de modo que esses outros agentes devem ser também no futuro investigados e monitorados, ou por técnicas de diagnóstico molecular ou de sorodiagnóstico, nessas mesmas granjas de frangos de corte.

Além disso, deve-se destacar também que sinais clínicos de doenças respiratórias e lesões no trato respiratório podem ser advindos de fatores abióticos e químicos do ambiente no qual a ave é criada, como por exemplo, a elevada concentração de amônia, que pode ser considerada ainda como um dos responsáveis pelo subdesenvolvimento das aves de corte e menor rendimento das carcaças, gerando enormes prejuízos do produtor, pois leva à diminuição do desenvolvimento do animal, bem como pode afetar negativamente a produção de ovos.

7. REFERÊNCIAS

ABPA (2015) Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual 2015. Disponível em <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em 30 mar. 2017.

Arns CW, Hafez HM (1995) Isolation and identification of avian pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. **Proceedings Of The 44st Western Poultry Diseases Conference** 124 -125.

Bäyon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M, Eterradossi N (1999) Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. **Archives of Virology** 144:1091–1109.

Bäyon-Auboyer MH, Arnould C, Toquin D, Eterradossi N (2000) Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. **Journal of General Virology** 81:1723–2733.

Barros MR, Nascimento ER, Silva JSA, Júnior JWP, Santos SB, Machado LS, Silva RCF, Mota RA (2014) Occurrence of *Mycoplasma synoviae* on commercial poultry farms of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(10):953-956.

Baseman JB & Tully JG (1997) Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerging Infectious Diseases** 3:21–32.

Baxter-Jones C, Grant M, Jones RC, Wilding GP (1989) A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus. **Avian Pathology** 18:91–8.

Behbahan NGG, Asasi K, Afsharifar AR, Pourbakhsh SA (2008) Susceptibilities of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolate to antimicrobial agents in vitro. **International Journal of Poultry Science** 7(11):1058-1064.

Bell IG, Alexander DJ (1990) Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis virus in Australian poultry flocks. **Australian Veterinary Journal** 67:232–3.

Boaro L, Kreutz LC, Poletto R, Uonfruhau M (2004) Ausência de anticorpos contra o vírus da síndrome da cabeça inchada em frangos de corte no Planalto Médio do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural – Santa Rita** 34(1):285-287.

Bradbury JM (2001) Avian mycoplasmas. **Poultry Diseases** 178–193, 5ª edição.

Branton SL, Lott BD, Maslin WR, Day EJ (1995) Fatty liver hemorrhagic syndrome observed in commercial layers fed diets containing chelated minerals. **Avian Disease** 39(3):631-35.

Buim MR, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira AJP (2009) Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 29:552-556.

Buys SB, Dupreez JH, Els HJ (1989) Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **Journal of the South African Veterinary Association** 60:221–2.

Casagrande RA, Castro LA, Rolim VM, Wouters F, Boabaid FM, Souza SO, Guerra PR, Silva SC, Driemeier D (2014) Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas de subsistência. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 34(2):153-161.

Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ (1999) Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology** 28(6):593-605.

Chacón JL, Brandão PE, Buim M, Villarreal L, Ferreira AJ (2007) Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. **Avian Pathology** 36(5):383-7.

Chacón JL, Mizuma M, Vejarano MP, Toquín D, Eterradossi N, Patnayak DP, Goyal SM, Ferreira AJ (2011) Avian metapneumovirus subtypes circulating in Brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey farms. **Avian Disease** 55(1):82-9.

Chettle NJ, Wyeth PJ (1988) Turkey rhinotracheitis: detection of antibodies using an ELISA test. **British Veterinary Journal** 144:282–7.

Cook JKA, Ellis MM, Dolby CA, Holmes HC, Finney PM, Huggins MB (1989) A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 1. Stability of the attenuated strain. **Avian Pathology** 18:511–22.

Cook JKA (2000) Avian pneumovirus infections of turkey and chickens. **The Veterinary Journal** 160:118–125.

Cook JKA & Cavanagh D (2002) Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). **Avian Pathology** 31:117–132.

Dani MAC, Arns CW, Durigon EL (1999) Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction analysis and sequencing of a G gene fragment. **Avian Pathology** 28(5):473-476.

De Nardi CPP, Lima ALM, Baptista F (2013) *Mycoplasma gallisepticum* in free-range chicken from Northern Tocantins State, Brazil. **African Journal of Microbiology Research** 7(46):5271-5273.

EMBRAPA (2018) – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves (Estatísticas no Mundo de Frangos de Corte). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

Enright MC, Spratt BG (1999) Multilocus sequence typing. **Trends In Microbiology** 7:482–487.

Etteradossi N, Toquin D, Guittet M, Bennejean G (1995) Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. **Journal of Veterinary Medicine - Series B** 42:175–86.

Fan HH, Kleven SH, Jackwood MW (1995) Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Disease** 39:729–735.

Fellipe PA, Silva LHA, Santos MB, Sakata ST, Arns CW (2011) Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. **Avian Pathology** 40(5):445-452.

García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Avian Disease** 49:125-132.

Geary SJ, Forsyth MH, Saoud SA, Wang G, Berg DE, Berg CM (1994) *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. **Molecular and Cellular Probes** 8:311–316.

Gharaibeh SM, Algharaibeh GR (2007) Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. **Poultry Science** 86:1677–1681.

Giraud P, Guittet M, Toquin D, Bennejean G (1987) Rhinotrachéite infectieuse de la dinde (RTI). Progrès récents dans l'étiologie et la prévention. **L'Aviculture** 477:47–53.

Gough RE, Collins MS, Cox WJ, Chettle NJ (1988) Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. **Veterinary Record** 123:58–59.

Gough RE (2003) Avian pneumoviruses. **Diseases of Poultry** 92–99, 11^a edição.

Grant M, Baxter-Jones C, Wilding GP (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. **Veterinary Record** 120:279–80.

Hafez HM, Emele J, Woernle H (1990) Turkey rhinotracheitis: Serological flock profiles and economic parameters and treatment trials using Enterofloxacin (Baytril). **Zeitschrift fur alle Gebiete der Veterinarmedizin** 45:111–14.

Heckert RA, Myers DJ (1993) Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian poultry. **Veterinary Record** 132:172.

Hong Y, Garcia M, Levisohn S, Savelkoul P, Leiting V, Lysnyansky IDH, Ley DH, Kleven SH (2005) Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. **Avian Disease** 49:43–49.

Hossam M, Wagih A, Elenbawy Mona E, Mahmoud E, Rehab E, Salah EDT (2016) The Recovery and Molecular Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Commercial Poultry Flocks in Egypt. **Indian Journal of Science and Technology** 9(29).

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Estatística da Produção Pecuária – Indicadores) (2017) Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2017.

Jones RC (1996) Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. **Avian Pathology** 25:639–48.

Jones RC (2010) Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? **British Poultry Science** 51(1):1-11.

Juhasz K, Easton AJ (1994) Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. **Journal of General Virology** 75:2873–2880.

- Kaszanyitzky E, Czifra G, Stipkovits L (1994) Detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in turkey blood samples by ELISA and by the slide agglutination and haemagglutination inhibition tests. **Acta Veterinaria Hungarica** 42(1):69-78.
- Kempf I, Blanchard A, Gesbert F, Guttet M, Bennejean G (1993) The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection. **Avian Pathology** 22:739-750.
- Kempf I (1998) DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology** 27(1):7-14.
- Khan MI, Lam KM, Yamamoto R (1987) *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **Avian Disease** 31:315-320.
- Khan MI, Kirkpatrick BC, Yamamoto R (1989) *Mycoplasma gallisepticum* species and strain specific recombinant DNA probes. **Avian Pathology** 18:135-146.
- Kleven SH, Morrow CJ, Whithear KJ (1988) Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. **Avian Disease** 32:731-741.
- Kleven SH (1997) Changing expectations in the control of *Mycoplasma gallisepticum*. **Acta Veterinaria Hungarica** 45:299-305.
- Kleven SH (2003) *Mycoplasma synoviae* infection. **Diseases of Poultry** 756-766.
- Kleven SH (2008) Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. **Avian Disease** 52(3):367-74.
- Levisohn S, Kleven SH (2000) Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). **Revue Scientifique Et Technique** 19(2):425-442.
- Ley HD & Yoder Jr, HW (1997) *Mycoplasma gallisepticum* infection. **Disease of poultry** 194-207, 10^a edição.
- Ley HD (2003a) *Mycoplasma gallisepticum* infection: introduction. **Diseases of poultry** 722, 11^a edição.
- Ley HD (2003b) *Mycoplasma gallisepticum* infection: etiology. **Diseases of poultry** 724, 11^a edição.
- Luttrell MP, Fischer JR, Stallknecht DE, Kleven SH (1996) Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. **Avian Disease** 40:335-341.
- Machado LS, Nascimento ER, Pereira VLA, Almeida DO, SILVA RCF, Santos LMM (2012) *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(7):645-648.
- Marois C, Dufour-Gesbert F, Kempf I (2001) Molecular differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* strains by pulsed-field gel electrophoresis and

random amplified polymorphic DNA. **The Journal of Veterinary Medical Science** 48:695–703.

Mase M, Yamaguchi S, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Nakamura K (2003) Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. **Avian Disease** 47:481–484.

McKissick JC (2006) **Poultry Industry Outlook**. The university of Georgia, Athens, USA. Disponível em: <http://www.ces.uga.edu/Agriculture/agecon/outlook/poultry/2006%20POULTRY%20INDUSTRY%20OUTLOOK.pdf>. Acesso em 30 mar. 2017.

Minharro S, Linhares GFC, Andrade MA, Rocha PT, Santana AP (2001) Envolvimento De *Mycoplasma Gallisepticum*, *Mycoplasma Synoviae* e *Escherichia Coli*, em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira** 2(2):111-117.

Much P, Winner F, Stipkovits L, Rosengarten R, Citti C (2002) *Mycoplasma gallisepticum*: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. **Immunology & Medical Microbiology** 34:181–186.

Nascimento ER, Yamamoto R, Khan M (1993) *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. **Avian Disease** 37:203–211.

Naylor CJ, Jones RC (1993) Turkey rhinotracheitis: a review. **The Veterinary Bulletin** 63:439–449.

NCRA. North Central Regional Association of Agricultural Experiment Station Directors. NC228: Avian Respiratory Diseases: Pathogenesis, surveillance, diagnosis and control. Disponível em: <https://www.nimss.org/projects/view/mrp/outline/1514>. Acesso em 30 mar. 2017.

O'loan CJ, Allan G, Baxter-Jones C, McNulty MS (1989) An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. **Journal of Virological Methods** 25:271–82.

OIE, (2008a). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). Disponível em http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf >. Acesso em: 30 mar. 2017.

OIE, (2008b). Turkey Rhinotracheitis (avian metapneumovirus infection). Disponível em http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.15_TURKEY_RHINO.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2017.

PNSA, (2003). Programa Nacional de Sanidade Avícola. Disponível em: <http://www.iagro.ms.gov.br/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa/>>. Acesso em: 30 set. 2019.

Okwara N (2016) Avian Mycoplasmosis: A Review. **Journal of Agriculture and Veterinary Science** 9:6-10.

Osman KM, Aly MM, Amin ZMS, Hasan BS (2008) *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. **Revue scientifique et technique** 28(3):1015-1023.

Pedersen JC, Reynolds DL, Ali A (2000) The sensitivity and specificity of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain). **Avian Disease** 44:681–685.

Pedersen JC, Senne DA, Panigrahy B, Reynolds DL (2001) Detection of avian pneumovirus in tissue and swab specimens from infected turkeys. **Avian Disease** 45:581–592.

Peres MF, Carrijo AS, Higa JÁ, De Oliveira JM (2006) Evidência sorológica de Pneumovírus aviário em lotes de frangos de corte em municípios de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26(4):254-258.

Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH (2006) The *Mycoplasma gallisepticum* 16S–23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence as a Novel Tool for Epizootiological Studies. **Avian Diseases** 51:555-560.

Razin S (1992) *Mycoplasma* taxonomy and ecology. **Society of Microbiology** 3-22.

Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:1094-156.

Rosengarten R, Yogev D (1996) Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. **Journal of Clinical Microbiology** 34:149–158.

Roussan DA, Haddad R, Khawaldeh G (2008) Molecular Survey of Avian Respiratory Pathogens in Commercial Broiler Chicken Flocks with Respiratory Diseases in Jordan. **Poultry Science** 87:444–448.

Sato S (1996) Avian mycoplasmosis in Asia. **Revue Scientifique Et Technique** 15(4):1555-1567.

Stuart JC (1989) Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. **Poultry Science Symposium, Series** (21):217–24.

Tan CG, Ideris A, Omar AR, Yii CP, Kleven SH (2013) Polymerase chain reaction-based discrimination of viable from non-viable *Mycoplasma gallisepticum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 81(1):1-7.

Tanaka M, Takuma H, Kokumai N, Oishi E, Obi T, Hiramatsu K, Shimizu Y (1995) Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science** 57:939–945.

Teixeira VCM, Baptista DQ, Carlos FC, Menezes WR, José DS, Barreto ML, Abreu DLC, Pereira VLA, Nascimento ER (2015) Situação epidemiológica da micoplasmose

aviária no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 37 (4):379-385.

Toquin D, De Boisseson C, Beven V, Senne DA, Etterradossi N (2003) Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes. **Journal of General Virology** 84:2169–2178.

UBABEF/UBPA Relatório Anual (2015). Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2017.

Van Den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine** 7:719–724.

Vogl S, Plaickner A, Szathmary S, Stipkovits L, Rosengarten R, Szostak MP (2008) *Mycoplasma gallisepticum* Invades Chicken Erythrocytes during Infection. **American Society for Microbiology** 71-77.

Williams RA, Savage CE, Jones RC (1991) Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. **Avian Pathology** 20:45–55.

Yamamoto R (1991) *Mycoplasma meleagridis* infection. **Diseases of poultry** 212-23.

Yoder S (1991) Isolation and identification of mycoplasma from respiratory system of chicken. **Poultry Science** 32(10):121–24.

Yogev D, Levisohn S, Kleven SH, Halachmi D, Razin S (1988) Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. **Avian Disease** 32:220–231.

8. ANEXO

Tabela 1- Dados Referentes às Amostras de Suabes Nasais de Frangos de Corte Analisadas

Nº da Amostra	Granja	Lote	Ave / tipo Produção	Idade	Região de Localização da Granja no Brasil
1	A	1	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
2	A	2	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
3	A	3	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
4	A	4	Frango de Corte	28 dias	Sudeste

5	A	5	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
6	A	6	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
7	B	1	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
8	B	2	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
9	B	3	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
10	C	1	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
11	C	2	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
12	C	3	Frango de Corte	28 dias	Sudeste
13	D	1	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
14	D	2	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
15	D	3	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
16	D	4	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
17	D	5	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
18	D	6	Frango de Corte	23 dias	Sudeste
19	D	7	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
20	D	8	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
21	D	9	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
43	E	1	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
44	E	2	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
45	E	3	Frango de Corte	38 dias	Sudeste
22	A	1	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
23	A	2	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
24	A	3	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
25	B	1	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
26	B	2	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
27	B	3	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
28	B	4	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
29	C	1	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
30	C	2	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
31	C	3	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
32	C	4	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
33	C	5	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
34	D	1	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
35	D	2	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
36	D	3	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
37	E	1	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
38	E	2	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
39	E	3	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
40	E	4	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
41	E	5	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
42	E	6	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
46	F	1	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste

47	F	2	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
48	F	3	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
49	F	4	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
50	F	5	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
51	F	6	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
52	F	7	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
53	G	1	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
54	G	2	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
55	G	3	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
56	G	4	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
57	G	5	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
58	G	6	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
59	G	7	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
60	G	8	Frango de Corte	40 dias	Centro-Oeste
61	G	9	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
62	G	10	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
63	G	11	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
64	G	12	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
65	G	13	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
66	G	14	Frango de Corte	36 dias	Centro-Oeste
67	H	1	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
68	H	2	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
69	I	1	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
70	I	2	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
71	I	3	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
72	I	4	Frango de Corte	41 dias	Centro-Oeste
73	J	1	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
74	J	2	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
75	J	3	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
76	L	1	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
77	L	2	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
78	L	3	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
79	M	1	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
80	M	2	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
81	M	3	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
82	M	4	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
83	M	5	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
84	M	6	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
85	M	7	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
86	M	8	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste
87	M	9	Frango de Corte	35 dias	Centro-Oeste

* Foram colhidas amostras de suabes nasais e traqueais de 10 aves com sinais clínicos de infecções respiratórias de cada lote por granja de um total de 15 granjas diferentes de frangos de corte localizadas nas regiões Sudoeste (5 granjas) e Centro-Oeste do país (10 granjas). Cada conjunto de 10 amostras foram reunidas em um pool correspondente a cada lote de aves amostrado.