

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARCUS MELLO REGO DE AMORIM

**Diagnóstico, avaliação epidemiológica e molecular de *Leishmania* spp. e
Mycoplasma spp. em granjas avícolas do Estado de Pernambuco.**

**Recife
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARCUS MELLO REGO DE AMORIM

**Diagnóstico, avaliação epidemiológica e molecular de *Leishmania* spp. e
Mycoplasma spp. em granjas avícolas do Estado de Pernambuco.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Recife

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Marcus e Flávia, pela educação que me deram e por acreditarem no meu potencial. As minhas irmãs, Fernanda e Luciana, pelo carinho e exemplo. Aos meus avós, Guy e Leda, pela história de vida e amor. A minha namorada Mayumi, pelo companheirismo nos momentos difíceis e pela ajuda na revisão desse trabalho.

Agradeço a todos do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas DMV-UFRPE, no nome de Prof. Rinaldo, Prof. Wilton Jr e Renata, por toda a ajuda na execução desse projeto. A todos da ornitopatologia, pela parceria em formar um grupo de pesquisa sólido. Ao Laboratório de Diagnóstico Animal (LADA), no nome de Sineide e Saruanna, pela disponibilidade do espaço e pelo auxílio na execução do projeto. Ao Laboratório Laudo e Laboratório Idexx pela doação dos antígenos e kits de ELISA, respectivamente.

Ao Prof. Elmiro, pelo envio das cepas, protocolos e ajuda em momentos de dúvida. A Profa. Mércia pela amizade, orientação e confiança. Ao Prof. Leucio, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A FACEPE e CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado. A UFRPE, pela formação e estrutura de pesquisa de qualidade. A todos os alunos da disciplina de Ornitopatologia, que por quase um ano foram meus alunos.

Agradeço a Avicultura Pernambucana por ter aberto as portas para minha pesquisa.

E em especial ao povo brasileiro, linhagem mestiça de grande potencial, mas que sofre ao longo de sua história por não poder decidir seu próprio destino. Saibam que estão todos os dias em meus pensamentos e é a esse povo guerreiro que pretendo dedicar minha vida.

Agradeço novamente a todos!

“A verdadeira dificuldade não está em aceitar ideias novas, mas escapar das antigas.”

(John Maynard Keynes)

“Presente, passado e futuro? Tólice. Não existem. A vida é uma ponte interminável. Vai-se construindo e destruindo. O que vai ficando para trás com o passado é a morte. O que está vivo vai adiante.”

(Darcy Ribeiro)

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho detectar molecularmente a presença de *Leishmania* spp., no sangue de poedeiras comerciais e diagnosticar e avaliar epidemiologicamente a infecção por *Mycoplasma* spp. em poedeiras comerciais e frangos de corte de granjas avícolas do Estado de Pernambuco. As amostras foram provenientes de 22 lotes oriundos de nove granjas, sendo seis de poedeiras comerciais e três de criações de frangos de corte. De cada lote foram colhidas amostras de sangue para obtenção de soro e posterior realização de testes sorológicos como soroaglutinação rápida (SAR), inibição da hemaglutinação (HI) e Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA), com soros (n=344); sangue total (n=120), suabes de traqueias (n=220) e traqueia (n=66) para a realização da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR). Do total de amostras submetidas a PCR, nenhuma apresentou positividade para *Leishmania* spp. Nos questionários investigativos realizados, nos seis lotes amostrados, já foram observadas outras espécies de animais, sendo aves silvestres e ratos presentes em todos os lotes e cães e bovinos em dois lotes. Em relação ao esterco, todas as granjas realizavam a retirada, quando o mesmo chegava próximo à altura das gaiolas de aviários do tipo californiano, com exceção do lote em galpão automatizado, no qual as fezes eram separadas por esteiras automáticas. Foi relatado em todos os lotes grande presença de moscas e mosquitos nos arredores e no interior dos aviários. Todas as granjas realizavam o controle de moscas e mosquitos através do controle químico, pela aplicação de produtos adulticidas e larvicidas. No diagnóstico sorológico de *Mycoplasma* spp., 14,82% (51/344) foram positivas para MG, enquanto que 28,49% (98/344) para MS na SAR, diluição de 1:10. E no teste de HI, 8,72% (30/344) e 20,35% (70/344) foram positivos para MG e MS, respectivamente, e no ELISA 45,64% (177/344) apresentaram soropositividade para MG e 57,26% (189/344) para MS. Entretanto, das amostras de suabe de traqueia e traqueia submetidas a PCR, 25,9% (57/220) e 42,27% (31/67) foram positivas para MG, respectivamente. 10% (22/220) das amostras de suabe de traqueia, enquanto 18,2% (12/66) de traqueia apresentaram positividade para MS. Na PCR vacinal, 56,14% (32/57) das amostras de suabe de traqueia positivas para MG foram oriundas da cepa vacinal MG-F, enquanto que das traqueias positivas 40,62% (13/32) foram da cepa MG-F. Com base nos questionários investigativos realizados nas granjas pode-se observar a presença de vários fatores de atração do vetor, sendo importante o aprofundamento sobre o papel da criação comercial de aves na epidemiologia da Leishmaniose. Ressalta-se a importância do uso de ferramentas sorológicas e moleculares na detecção de MG e MS, visto que foi possível detectar o DNA do agente em lotes que não apresentaram soroconversão nos testes sorológicos e vice e versa. Além da PCR convencional, a PCR de diferenciação de cepas de campo de cepa vacinal se mostra fundamental por conta da capacidade de detectar diferentes cepas em um lote de aves.

Palavras-chave: Avicultura, Leishmaniose, Micoplasmose, Sorologia, Biologia molecular.

ABSTRACT

The objective of this work was to detect molecularly the presence of *Leishmania* spp. in the blood of commercial laying hens and to diagnose and epidemiologically evaluate *Mycoplasma* spp. in commercial laying hens and broiler chickens from poultry farms in the State of Pernambuco. Samples were obtained from 22 lots from nine farms, three from broiler chickens and six from commercial laying hens. From each flock, blood samples were obtained for serological tests (n = 344) serological such as, Rapid Plate Agglutination (RPA), Hemagglutination inhibition (HI) e Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA); whole blood (n = 120), tracheal swabs (n = 220) and trachea (n = 66) were used to perform molecular tests (PCR). None sample, submitted to PCR, showed positivity for *Leishmania* spp. In the questionnaires carried out, other animals' species were observed in the six sampled flocks, being wild birds and rats present in all flocks and dogs and cattle in two flocks. As far as manure was concerned, all the farms carried out the removal when it reached the height of the cages in the Californian type aviaries, except for the automated shed in which the feces were separated by automatic mats. Many flies and mosquitoes were reported in the surroundings and inside the aviaries. All farms carried out control of flies and mosquitoes through chemical control, by the application of adulticides and larvicides. In the *Mycoplasma* spp. serology diagnosis, 14.82% (51/344) of the samples were positive for MG, whereas 28,4% (98/344) samples were positive for MS in the SAR, 1:10 dilution. In the HI test, 8.72% (30/344) and 20.35% (70/344) were positive for MG and MS, respectively. In ELISA, 45,64% (177/344) presented seropositivity for MG and 57,26% (189/344) for MS. Of the trachea and trachea swab samples submitted to PCR, 25.9% (57/220) and 42.27% (31/67) were positive for MG, respectively. 10% (22/220) of the tracheal swab specimens, while 18.2% (12/66) of the trachea had MS positivity. In the vaccine PCR, 56.14% (32/57) of the MG tracheal swab samples were from the MG-F strain, whereas 40.62% (13/32) of the positive trachea were vaccine strains. Based on the research questionnaires carried out on the farms, we could observe the presence of several vector attraction factors, being important new researches on the role of commercial poultry production in the epidemiology of Leishmaniasis. Was observed the importance of the use of serological and molecular tools in the diagnosis of MG and MS, as it was possible to detect the DNA of the agent in flocks that did not seroconverted in the serological tests and vice versa. In addition to conventional PCR, the vaccine differentiation PCR is fundamental because of the ability to detect different strains in a flock of birds.

Keywords: Poultry production, Leishmaniasis, Micoplasmosis, Serology, Molecular biology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Leishmaniose.....	11
2.1.1. Papel da galinha doméstica na Leishmaniose.....	12
2.1.2. Diagnóstico molecular de <i>Leishmania</i> spp.....	13
2.2. Micoplasmose na avicultura.....	14
2.2.1. Diagnóstico.....	16
2.2.2. Controle e prevenção.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Geral.....	19
3.2. Específicos.....	19
4. REFERÊNCIAS.....	20
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	23
5.1. Artigo 1 - Detecção molecular de <i>Leishmania</i> spp. em granjas de poedeiras comerciais do Estado de Pernambuco.....	29
5.2. Artigo 2 - Diagnóstico sorológico e molecular da infecção por <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> em granjas avícolas do Estado de Pernambuco.....	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	Coleção de Cultura Americana
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CV	Coeficiente de variação
DCR	Doença crônica respiratória
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EAA	Anormalidade no Ápice da Casca
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaioimunoabsorçãoenzimático
FC	Frango de corte
GMT	Média Geométrica dos Títulos
HRPO	Peroxidase Horseradish
IB	Bronquite Infecciosa
ILT	Laringotraqueíte infecciosa
LDIC	Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas
LV	Leishmaniose Visceral
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MG-F	Cepa vacinal F
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Poedeira comercial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Período de incubação
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
SAR	Soro Aglutinação Rápida
TMB	Tetrametilbenzidina
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição e amostragem dos lotes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).
(ARTIGO 2).....35
- Tabela 2.** Primers utilizados nas reações de PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e cepa vacinal MG-F.
(ARTIGO 2).....37
- Tabela 3.** Resultado de diferentes testes sorológicos para detecção de anticorpos contra MG e MS provenientes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).
(ARTIGO 2).....38
- Tabela 4.** Resultado da concordância Kappa entre os testes sorológicos de SAR e HI; e SAR e ELISA.
(ARTIGO 2).....38
- Tabela 5.** Detecção por meio da PCR convencional e PCR Nested de MG e PCR convencional para MS de amostras de suabe de traqueia e traqueia provenientes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).
(ARTIGO 2).....39
- Tabela 6.** Detecção por meio da PCR da estirpe MG-F de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC) positivas na PCR convencional e PCR Nested. (ARTIGO 2).....39

1. INTRODUÇÃO

A avicultura é uma das atividades agropecuárias que mais tem se desenvolvido, aumentando exponencialmente a produção de ovos e de aves abatidas, possibilitando a produção de fontes proteicas a baixo custo, saudáveis e de alta qualidade (BOLIS et al., 2001).

Na produção de carne de frango, o estado de Pernambuco é o segundo maior produtor da região Nordeste. Em 2017 a avicultura pernambucana produziu aproximadamente 140 mil toneladas de carne de frango em estabelecimentos sob inspeção, representando 29,5% do que é produzido no Nordeste e 1,03% da produção brasileira (IBGE, 2017a). No que diz respeito à produção de ovos para consumo, é o maior produtor da região Norte e Nordeste produzindo em 2017 aproximadamente 231.494 mil dúzias de ovos, o que representa 4,96% em relação à produção do Brasil. Assim, o Estado ocupa a sétima posição no *ranking* nacional da produção de ovos (IBGE, 2017b).

A avicultura de Pernambuco é uma cadeia bastante consolidada, que atende as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o que a habilita para a comercialização nos mercados nacional e internacional demonstrando a importância de pesquisas sobre fatores, saúde animal ou saúde pública, que podem influenciar negativamente a indústria avícola (SEBRAE, 2008).

A importância das Leishmanioses se observa nas potenciais consequências que produzem na saúde pública devido à alta letalidade, incidência e implicações econômico-sociais que ocorrem pela debilitação do trabalhador (BORASCHI; NUNES, 2007).

A proximidade de habitações humanas a criações de galinhas é reconhecida como possível fator de risco ambiental em estudos de Leishmaniose visceral, principalmente associado a preferência alimentar do vetor (ARIAS et al., 1996; GENARO et al., 1990). Contudo, segundo Alexandre et al. (2012), as galinhas podem ser um fator de risco principalmente pela manutenção de vetores próximos as habitações, entretanto, a mesma não consegue sustentar infecções, sendo refratária.

Outra enfermidade que pode causar prejuízos significativos à avicultura, não por afetar a saúde dos trabalhadores, mas por estar relacionada com queda na postura, redução de desempenho, condenação de carcaças, aumento da

mortalidade, gastos com programas de controle e medicamentos, são as micoplasmoses (NASCIMENTO et al., 2005).

Em 1994, o MAPA implantou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) no Brasil, que inclui as micoplasmoses entre as doenças de controle e erradicação em plantéis avícolas (BRASIL, 1994). Portanto, a rápida detecção, utilizando diferentes métodos de diagnóstico, da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* é de suma importância para a indústria avícola, permitindo a implementação de programas de controle e monitoramento eficazes (KEMPF, 1998).

Tendo em vista a representatividade econômica da avicultura para o Brasil, objetivou-se com este trabalho detectar molecularmente *Leishmania* spp. no sangue de poedeiras comerciais, além de diagnosticar e avaliar epidemiologicamente a infecção por *Mycoplasma* spp. em poedeiras comerciais e frangos de corte de granjas avícolas do Estado de Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmaniose

É uma doença causada por parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes à Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmaniae* Subgêneros *Leishmaniae* *Viannia* as quais completam seu ciclo de vida em dois diferentes hospedeiros (BEDOR, 2003).

Leishmania spp. apresenta duas formas distintas ao longo do seu ciclo biológico heteroxeno: a primeira denominada amastigota, encontrada no hospedeiro vertebrado medindo entre 2 a 5 µm, podendo em sua célula ser diferenciado o citoplasma e o cinetoplasto (SUNDAR;RAI, 2002), e a segunda denominada promastigota com 10 a 15 µm que se encontra no inseto vetor (NOLI, 1999).

Mais de cinco espécies do gênero *Leishmania* são conhecidas no Brasil, sendo duas agrupadas no subgênero *Leishmania*, como *Leishmania (Leishmania) infantumchagasie* *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; e seis no subgênero *Viannia*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi*, *Leishmania (Viannia) naiffie* *Leishmania (Viannia) shawi* (LAINSON; SHAW, 1998; SILVEIRA et al., 2002; FREITAS, 2010).

A Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar é uma doença parasitária de caráter zoonótico e distribuição cosmopolita (WHO, 1996), sendo que cinco países concentram 90% dos casos de LV, são eles: Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul e o Brasil (DAVIDSON, 1999), em que das 27 unidades federativas, 19 destas relataram casos da doença, incluindo o estado de Pernambuco (BRASIL, 2004)

Atualmente a enfermidade passa por um processo de urbanização, apesar de ocorrer primariamente em meio rural (BRASIL, 2004). O Nordeste, entre as diversas áreas da Federação Brasileira, é a região que detém a maior parte dos casos humanos (TAVARES e TAVARES, 1999), sendo sua ocorrência relacionada com problemas sanitários e à subnutrição (ALVES; FAUSTINO, 2005), além presença do reservatório canino e da alta densidade do vetor (BADARÓ et al., 1996).

Lutzomyia longipalpis pertence à família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, sendo o díptero responsável pela transmissão da agente nas Américas (ROSÁRIO et al., 2005) e caracteriza-se por habitar locais variados e ter o período de maior atividade entre 18 e 22 horas. Entretanto, as formas imaturas

desenvolvem-se em ambientes de baixa incidência luminosa, ricos em matéria orgânica e úmidos (THOMÉ, 1999; FEITOSA et al., 2000) o que torna difícil o controle dos seus criadouros (THOMÉ, 1999).

A transmissão da *Leishmania* spp. ocorre devido a inoculação de promastigotas durante o hematofagismo (RAMOS et al., 2004). No hospedeiro vertebrado as formas promastigotas invadem macrófagos e iniciam o processo de replicação para assim infectar outras células e disseminar-se pelo organismo. Em alguns casos a multiplicação do parasito nos hospedeiros vertebrados sofre influência da resposta imune protetora em que o parasito pode ser destruído em função da ação dos linfócitos T (ROITT et al., 1999; GAMA et al., 2004; MURRAY et al., 2005; CAMPOS, 2007).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença de um vetor biológico para a transmissão do parasito e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível (GONTIJO; MELO, 2004).

2.1.1. A galinha doméstica (*Gallus gallus*) e a Leishmaniose

A utilização de galinhas como animais sentinela tem sido descrita em diversas doenças tais como *West Nile Virus* (WNV) nos Estados Unidos (REISEN et al., 2009), *Avian Influenza* na França e Holanda e *St. Louis encephalitis* nos Estados Unidos (RACLOZ et al., 2007), sendo utilizadas em programas de controle epidemiológico.

Estes animais auxiliam na investigação das mudanças que ocorrem na prevalência ou incidência de uma determinada doença, identificação ou monitoramento de epidemias causadas por agentes infecciosos, além de avaliar a eficácia de programas de controle epidemiológico instituído em determinada área (RACLOZ et al., 2007).

Além de apresentarem anticorpos contra antígenos de patógenos, as galinhas também são usadas como sentinelas em programas de monitoramento de infestação de vetores. Na Bolívia, essas aves têm se mostrado eficientes no controle de vigilância epidemiológica, uma vez que apesar de não se infectarem por *Tripanossoma cruzi*, são capazes de desenvolver rapidamente resposta imune detectável contra componentes da saliva do vetor, os triatomíneos (SCHWARZ et al., 2009a).

Atualmente já se sabe que aves expostas a picadas de artrópodes hematófagos desenvolvem anticorpos contra componentes da saliva desses vetores (SCHWARZ et al., 2009a). Entretanto, apesar da importância epidemiológica de galinhas como sentinelas em diferentes doenças, não existem estudos que evidenciem o papel dessas aves sentinelas para Leishmaniose (SOARES, 2012).

De maneira geral, as aves apresentam características fisiológicas como a temperatura corporal de 41,0°C e pela atividade do sistema complemento que impede o desenvolvimento do protozoário, impedindo-as de manter essas infecções por um período prolongado (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; OTRANTO, et al., 2009).

A proximidade das criações de galinhas em locais peridomiciliares pode aumentar o risco de infecções, pois mantém uma população de mosquito palha elevada através da provisão de fontes alimentares. Ainda, ao contrário da maioria das espécies, as galinhas apresentam-se inativas durante o período da noite e apresentam grandes áreas de pele exposta (no qual o flebótomo pode se alimentar), além de possuir menores níveis de hemoglobina (FREEMAN, 1984). A crista e as barbelas são ricas em capilares e a epiderme é muito mais fina (0,02 mm), além das áreas emplumadas do corpo, que poderiam assim ser perfuradas mais facilmente pela probóscide (ALEXANDER, 2002). Além disso, espécies sinantrópicas que invadem galinheiros, como a raposa (*Cerdocyonthus*), o gambá (*Didelphisalbiventris*) e o rato preto (*Rattusrattus*), são potenciais reservatórios de *L. infantum* (SHERLOCK, 1996).

Em um estudo realizado por Rodrigues et al. (1999) na Bahia, foi constatado que pessoas que possuem criações de galinhas no quintal possuem 4,21 vezes mais chances de terem LV quando comparado com pessoas que não criam. Esse fator potencial de atração do vetor ao ambiente avícola também pode ser justificado com relação a produção de biomassa, perda de calor (uma função da relação superfície/volume) e produção de CO₂ (KELLY; MUSTAFA; DYE, 1996) das aves. As galinhas produzem 19-26 m³/kg de peso corporal de CO₂ por minuto (FEDDE; WEIGLE; WIDEMAN, 1998), valor superior quando comparado com cães (13-17 m³/kg) e humanos (8-11 m³/kg) (PETERS, 1983).

Portanto, a relação entre galinhas e os flebôtomos se dá principalmente devido ao grande fator atrativo que aviários e galinheiros são para o *L. longipalpis*, o

qual encontra neste local, abundância de alimento e matéria orgânica úmida para seus criadouros (TEODORO et al., 1999).

2.1.2. Diagnóstico molecular de *Leishmania* spp.

Várias técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas desde a década de 80 com a intenção de detectar e identificar de forma precisa os parasitas do gênero *Leishmania*, sem o isolamento em cultura de células ser necessário (GONTIJO; MELO, 2004).

Técnicas que visam à amplificação de áreas do DNA estão disponíveis para identificação e caracterização do parasita. Inúmeros tipos de amostras biológicas tais como aspirados de medula óssea, esplênicos, de linfonodos, camada leucocitária e sangue total, podem ser empregados como fonte de material para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (TAVARES et al., 2003).

Em estudos realizados por Schalling e Oskan, (2002) vários métodos baseados na PCR têm sido desenvolvidos em estudos com LV, a técnica tem sido usada com várias aplicações além do diagnóstico do agente, tais como estudos epidemiológicos e monitoramento do tratamento.

A PCR tem sido descrita como uma técnica sensível para a identificação de *Leishmania* spp. (WEISS, 1995). Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR para o diagnóstico de LV utilizando o sangue periférico de animais, pela facilidade de coleta (LACHAUD et al., 2001).

2.2. Micoplasmose na avicultura

Na década de 60 a denominação de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) foi proposta por Edward e Kanarek (1960) e Olson et al. (1964), respectivamente. Nesse mesmo período, por volta de 1955 e 1965, conceitos importantes e fundamentais foram convencionados como: ambos agentes podem ser transmitidos verticalmente e lotes de aves livres desses microrganismos são mais produtivos quando comparados com lotes positivos (LANCASTER; FABRICANT, 1988). Ainda, percebeu-se que bactérias desse gênero estão dispersos pelos diferentes ambientes infectando diversas espécies de peixes, répteis, aves e mamíferos (ELGNAY; AZWAI, 2013).

Os micoplasmas fazem parte da classe das *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales* e família *Mycoplasmataceae* (BROWN et al., 2007). As principais *Mollicutes* de interesse aviário medem 200 a 300nm, têm formato pleomórficos, cocobacilar ou cocóide e são Gram negativos (KLEVEN, 2003a). Aproximadamente 20 espécies, dentro da classe *Mollicutes* com características individuais e pertencentes a três diferentes gêneros (*Acholeplasma*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*), já foram isoladas de aves (NASCIMENTO et al., 1982b; KLEVEN, 2003a).

Existem diversas cepas de *Mycoplasma gallisepticum*, diferenciadas genotípica e fenotipicamente (KHAN et al., 1987, 1989; KLEVEN, et al., 1990; NASCIMENTO et al., 1991), que apresentam graus variados de virulência e patogenicidade entre elas e influenciando, portanto, no estímulo imunogênico nas aves. Assim como MG, também é possível constatar em MS uma grande variabilidade de cepas e diferentes graus de patogenicidade (KLEVEN, 1991; YAMAMOTO, 1991; CHIN et al., 1993).

A transmissão pode ocorrer de forma horizontal por contato direto (aerossóis ou venérea) ou indireto (ração, água, pessoas, aves silvestres e fômites) e por via vertical, sendo transmitido pelo contato direto do óvulo com os sacos aéreos abdominais afetados, infectando posteriormente o infundíbulo e futuros ovos (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

O *Mycoplasma gallisepticum* é o agente etiológico da doença crônica respiratória (DCR) e pode causar sinais clínicos variados como dificuldade respiratória, secreção nasal, sinusite, aerossaculite, diminuição da produção de ovos e aumento da mortalidade embrionária (MOHAMMED et al., 1987). Também são relatadas redução do ganho de peso e a degradação da qualidade da carcaça em frangos de corte (STIPKOVITS; KEMPF, 1996; BRADBURY, 2007).

O trato respiratório superior atua como principal porta de entrada para a infecção natural por MG, sendo a traqueia o local preferencial de infecção para a maioria das cepas. Embora, os sinais de doença geralmente se manifestam em outras partes do sistema respiratório (sacos aéreos ou seios nasais), a traqueia funciona como reservatório do agente, sendo possível detectar sua presença antes mesmo da primeira resposta sorológica (LEVISOHN; DYKSTRA, 1987; YAGIHASHI; TAJIMA, 1986).

Uma característica particular da patogênese de MG é a sua habilidade de alterar seu perfil antigênico e evadir o sistema imunológico do hospedeiro

(LEVISOHN; DYKSTRA, 1987). Essa patogenicidade pode ser ainda mais complexa devido à capacidade de penetração e sobrevivência dentro de células hospedeiras resultando em disseminação para todos os sistemas (MUCH et al., 2002), o que pode desencadear uma infecção crônica do hospedeiro (BENCINA, 2002; WINNER et al., 2000).

Semelhante à MG, *Mycoplasma synoviae* pode causar problemas respiratórios tanto em galinhas quanto em perus, e afetar a qualidade da casca do ovo com anormalidades típicas no ápice da casca (EAA) além de comprometer a produção (FEBERWEE et al., 2009; CATANIA et al., 2010; RANCK et al., 2010).

Os prejuízos financeiros atribuídos a MS estão associados, em sua maioria, à queda na postura de ovos (5-10%) e má qualidade do ovo, baixa eclodibilidade, pior conversão alimentar, aumentado percentual de mortalidade e condenação de carcaça em frangos de corte, acarretando maiores custos com programas de controle e medicamentos (STIPOKVITS, KEMPFT, 1996; NASCIMENTO et al., 2005).

2.2.1. Diagnóstico

Para confirmação da infecção por micoplasma é necessário a realização do diagnóstico epidemiológico (mortalidade, morbidade e dados da produção), diagnóstico clínico e anatomopatológico (sinais clínicos e achados de necropsia) e confirmados por meio de exames laboratoriais, detectando-se a presença de anticorpos e/ou do agente (CHARLTON et al., 1996).

As metodologias baseadas em testes sorológicos foram estabelecidas para atender a vigilância necessária para garantir e posteriormente certificar a negatividade dos lotes. A soroaglutinação rápida (SAR) é o teste de triagem mais realizado como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses. Se o soro apresentar reação na diluição de 1:1, 1:5 e finalmente na diluição de 1:10, o resultado é considerado positivo, sendo confirmado utilizando o teste de ELISA ou teste de inibição da hemaglutinação (HI), além de isolamento e/ou técnicas de biologia molecular (BRASIL, 1994; BRASIL, 1999).

O diagnóstico de MG e MS pelo uso de reação em cadeia da polimerase (PCR) teve a participação pioneira de pesquisadores brasileiros (NASCIMENTO et

al., 1991; NASCIMENTO et al., 1993; NASCIMENTO et al., 1994; SILVEIRA et al., 1996).

Com a padronização da técnica, foi possível amplificar e analisar o DNA sem a necessidade de cultivo do microrganismo (MADIGAN, 2004), principalmente por serem agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento como são os micoplasmas, além da rapidez, alta sensibilidade, e-especificidade e segurança dos resultados (MACHADO et al., 2012).

Igualmente importante é a capacidade de obter resultados precisos na presença de infecções subclínicas (MACHADO et al., 2012), infecção mista com várias espécies de micoplasmas, contaminação por infecções bacterianas secundárias e inibição do crescimento por antibióticos, anticorpos ou outros fatores inibidores (KEMPF et al., 1994). Além de ser possível a detecção do patógeno antes que este induza uma resposta imunológica, ou então em hospedeiros imunodeprimidos, demonstrando vantagens sobre os testes sorológicos (MORENO, 2009).

Segundo Mettifogo et al. (2015), após a vacinação não é possível distinguir anticorpos da estirpe vacinal com anticorpos de campo, o que torna o monitoramento do lote mais difícil, portanto, a capacidade para distinguir a estirpe de MG-F de outras estirpes de MG pela PCR demonstra a possível aplicação deste método em programas de monitoramento e avaliações de desempenho da vacina em granjas de poedeiras comerciais. Além disso, esta cepa pode ser potencialmente disseminada, podendo causar sinais clínicos de infecção respiratória em frangos de corte jovens ou em frangos de corte adultos, já que a estirpe não é totalmente não-patogênica.

2.2.2. Controle e prevenção

O controle da infecção por MG e MS é essencial em todas as etapas da cadeia de produção avícola para evitar a perda de produtividade devido à diminuição da produção e qualidade dos ovos, redução da eficiência alimentar e altas taxas de condenação das carcaças (KLEVEN, 2008a; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Segundo Whithear (1996) e Kleven (2003) a erradicação do *Mycoplasma* spp. muitas vezes não é economicamente viável pela eliminação de plantéis infectados, por isso, a medicação e vacinação podem ser alternativas sustentáveis para a

redução dos sinais clínicos, da transmissão vertical e do impacto econômico. Outro aspecto importante é a aquisição de aves de um dia ou ovos férteis livres de *Mycoplasma* spp., para os sistemas de postura, engorda e reprodução (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

O uso de antibióticos, principalmente aqueles que atingem altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório, como tiamulin e enrofloxacin podem afetar a detecção do agente, inibindo ou reduzindo a resposta imunológica, indisponibilizando o patógeno no trato respiratório superior, dificultando o isolamento tanto em frangos de corte quanto em aves de reprodução ou postura. Outro aspecto importante em relação à terapia com antimicrobianos é que por conta da ausência de parede celular, os micoplasmas são naturalmente resistentes a antibióticos β -lactâmicos que atuam na parede celular, como a penicilina e a cefalosporina (KLEVEN, 2008).

Enquanto que, a vacinação pode desempenhar um papel importante na prevenção de doenças respiratórias, pois pode proteger contra o desenvolvimento de lesões traqueais e sinais clínicos nasais, além de ser capaz de reduzir a queda na produção de ovos. Entretanto, pode causar reações falsas positivas nos testes sorológicos sendo considerado um método para reduzir danos, não sendo mais adequado na prevenção de infecções (WHITHEAR, 1996; EVANS et al., 2005).

Atualmente, existem vacinas comerciais contra MG, disponibilizadas na forma inativada e viva, a disposição dos criadores de aves. A vacina viva não deve ser usada em reprodutoras (galinhas e perus) por prejudicar o diagnóstico e, principalmente, o monitoramento epidemiológico, sendo aconselhável apenas para poedeiras (BALÉM et al., 1992; BRASIL, 1994; BRASIL, 2001).

As principais cepas vacinais, como a cepa F, ts11, MG70 e 6/85, têm sua eficiência com base na resposta imune humoral e celular. Além de realizar exclusão competitiva com as cepas circulantes de campo, o uso dessas vacinas ainda pode diminuir a característica queda na produção de ovos, apesar de não prevenirem a transmissão transovariana do agente (CARPENTER, 1981; LEY, 2003).

Uma estratégia de monitoramento consistente é fundamental para a prevenção da infecção por *Mycoplasma* spp. Assim como de outras enfermidades aviárias relevantes, programas voluntários para granjas de aves reprodutoras têm sido desenvolvidos por órgãos governamentais em parceria com a iniciativa privada, a exemplo do “National Poultry Improvement Plan” (NPIP) nos EUA e do Programa

Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) em nosso País (BRASIL, 1994). De acordo com esses programas, as aves reprodutoras, devem ser acompanhadas por monitoramento sorológico ou micoplasmológico para MG, MS ou MM, seguindo procedimentos epidemiológicos de amostragem e monitoramento com periodicidade não superior a três meses. Os testes utilizados no monitoramento são os mesmos usados no diagnóstico: SAR, HI e ELISA, além do diagnóstico microbiológico, que envolve isolamento e tipificação ou PCR (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Detecção molecular de *Leishmania* spp. e diagnóstico sorológico e molecular da infecção por *Mycoplasma* spp. em aves de granjas avícolas do Estado de Pernambuco.

3.2. Específicos

- Detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. por meio da PCR em granjas de poedeiras comerciais.
- Caracterizar molecularmente a (s) espécie (s) de *Leishmania* spp. detectadas em granjas de poedeiras comerciais.
- Avaliar o papel das aves domésticas como indicadores biológicos da infecção por *Leishmania* spp.
- Utilizar os testes sorológicos SAR, HI e ELISA para detecção de anticorpos contra *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em aves saudáveis e com sinais clínicos respiratórios.
- Detectar a presença de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* por meio da PCR convencional e PCR “nested”, em suabes e fragmentos de traqueia de aves saudáveis e com sinais clínicos respiratórios.
- Diferenciar por meio da PCR, cepas de campo de cepa vacinal de *M. gallisepticum*.
- Identificar os fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma* spp. e a presença de *Leishmania* spp. nas granjas avícolas do Estado de Pernambuco.

4. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, H. Role of the Domestic Chicken (*Gallus gallus*) in the Epidemiology of Urban Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480, 2002.
- ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Leishmaniose visceral canina Manual da Schering Plough, p. 14, 2005.
- ARIAS, J. R.; MONTEIRO, O. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 145, 1996.
- BADARO, R.; BENSON, D.; EULALIO, M. C. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758-761, 1996.
- BALÉM, L.; SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Proteção de galinhas pela cepa vacinal conn-F de *Mycoplasma gallisepticum* na forma liofilizada e como cultura fresca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 1, p. 49-56, 1992.
- BEDOR, C. N. G. **Sequenciamento e caracterização de genes identificados como codificantes para proteínas antigênicas de *Leishmania chagasi***. 75 f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. **Avian Pathology**, v. 31, n. 6, p. 535-547, 2002.
- BOLIS, D. A. Biosseguridade na criação alternativa de frangos. In: **Conferência de ciência e tecnologia avícola – apinco**, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, p. 223-234, 2001.
- BORASCHI, C. S. S.; NUNES, C. M. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose visceral urbana no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 71, n. 1, p. 44-48, 2007.
- BRADBURY, J. M. Biosecurity and vaccination control *Mycoplasma* infections. **World Poultry**, v. 23, p. 35-36, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Defesa Animal. Normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos ou estabelecimento avícola livres de micoplasmoses aviárias. **Diário Oficial da União**, n. 24, Seção I, Brasília, 1 de julho de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, 2004.

BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria Ministerial 193. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 de setembro de 1994.

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

CAMPOS, R. M. **Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da Leishmaniose visceral**. 114f. Recife, PE. Dissertação (Mestrado), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

CARPENTER, T. E.; MALLINSON, E. T.; MILLER, K. F.; GENTRY, R. F.; SCHWARTZ, L. D. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. **Avian Diseases**, v. 25, n. 2, p. 404-409, 1981.

CATANIA, S.; BILATO, D.; GOBBO, F.; GRANATO, A.; TERREGINO, C.; IOB, L.; NICHOLAS, R. A. J. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 961-964, 2010.

CHARLTON, B. R.; BERMUDEZ, A. J.; BOULIANNE, M.; ECKROADE, R. J.; JEFFREY, J. S.; NEWMAN, L. J.; SANDER, J. E.; WEKENELL, P. S. Whiteman and bickford's avian disease manual. 4th ed. Pennsylvania, **American Association of Avian Pathologists**, 1996.

CHIN R. P.; ZHAO, S.; YAMAMOTO, R.; NASCIMENTO, E. R. Comparison of polymerase chain reaction and isolations procedures in the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from clinical specimens. **42nd Western Poultry Disease Conference**; Sacramento, California. EUA. p. 81-82, 1983.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral Leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

DAVIDSON, R. N. Canine leishmaniasis: an update. In: International canine Leishmaniasis Forum, 1999, Barcelona. Proceedings of the International canine leishmaniasis forum. **Barcelona: Hoechst Roussel Vet.**, p. 72-77, 1999.

EDWARD, D. G.; KANNAREK, A. D. Organisms of the pleuropneumonia group of avian origins: their classification into species. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 79, n. 10, p. 696-702, 1960.

ELGNAY, F.; AZWAI, S. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in one day old broiler chickens in Libya. **Journal of Animal and Poultry Science**, v. 2, n. 1, p. 11-18, 2013.

EVANS, J.; LEIGH, S.; BRANTON, S.; COLLIER, S.; PHARR, G.; BEARSON, S. *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 4, p. 757-763, 2005.

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

FEDDE, M. R.; WEIGLE, G. E.; WIDEMAN, R. F. Influence of feed deprivation on ventilation and gas exchange in broilers: relationship to pulmonary hypertension syndrome. **Poultry Science**, v. 77, n. 11, p. 1704-1710, 1998.

FEITOSA, M. M., IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R., & PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FREEMAN, B. M. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. **London: Academic Press**, p. 33-34, 1984.

FRETAS, T. P. T. A ecoepidemiologia das Leishmanioses: levantamento de flebotomíneos em Cuiabá e investigação quanto a participação de roedores e marsupiais em Rondonópolis, Mato Grosso. 103f. Cuiabá, MT. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; PEREIRA, J. C.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Serumcytokine profile in the subclinical form of visceral Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.1, p.129-136, 2004.

GENARO, O.; DA COSTA, A.; WILLIAMS, P.; SILVA, J. E.; ROCHA, N. M.; LIMA, S. L. Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 2, p. 121, 1990.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA – IBGE. **Censo agropecuário 2017: resultados preliminares**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA - IBGE. **Abate - Pesquisa trimestral do abate de animais**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/abate/tabelas>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2018.

KELLY, D. W.; MUSTAFA, Z.; DYE, C. Density-dependent feeding success in a field population of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Animal Ecology**, v. 65, n. 4, p. 517-527, 1996.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1998.

KEMPF, I.; BLANCHARD, A.; GESBERT, F.; GUITTET, M.; BENNEJEAN, G. Comparison of antigenic and pathogenic properties of *Mycoplasma iowae* strains and development of a PCR-based detection assay. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 2, p. 179-185, 1994.

- KHAN, M. I.; LAM, K. M.; YAMAMOTO, R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. **Avian Disease**, v. 31, n. 2, p. 315-320, 1987.
- KLEVEN, S. H. *Mycoplasma synoviae* e infection. **Diseases of Poultry**, 11th ed. p. 756-766, 2003.
- KLEVEN, S. H. MYCOPLASMOSIS. IN SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. (Eds.). **Diseases of Poultry**, 12th ed., p. 805-807, 2008.
- KLEVEN, S. H.; KHAN, M. I.; YAMAMOTO. R. Fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from multiple- age layers vaccinated with live F-strain. **Avian Diseases**, v. 34, n. 4, p. 984-990, 1990.
- KLEVEN, S. H.; ROWLAND, G. N.; OLSON, N. O. *Mycoplasma synoviae* infection. Calneck BW, Burnes HJ, Beard CW, Yoder Jr. HW. **Diseases of Poultry**, 9th ed. Ames: Iowa State University Press. p. 223-231, 1991.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; REYNES, J.; LAMOTHE, J.; BASTIEN, P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral Leishmaniasis using peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 613-617, 2001.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. Arnold: London**, p. 242-266, 1998.
- LANCASTER, V. T.; FABRICANT, J. The history of Avian Medicine in the United States. IX. Events in the history of Avian Mycoplasmosis, 1905-70. **Avian Diseases**, v. 32, n. 4, p. 607–623, 1988.
- LEVISOHN, S.; DYKSTRA, M. J. A quantitative study of single and mixed infection of the chicken trachea by *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 31, n. 1, p. 112, 1987.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection, In CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L.R.; SAIF, Y. M. (ed), **Diseases of Poultry**, 11th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa., p. 722-744, 2003.

- MACHADO, L. S.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; ABREU, D. L. C.; BARRETO, M. L. Revisão: MICOPLASMOSES AVIÁRIAS. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia**, v. 8, n. 15, p. 1527-1544, 2012.
- MADIGAN, M.T.; MARTUSKO, J.M.D.; PARKES, J. **Microbiologia de Brock. 10. ed. São Paulo**, Cap.10, 2004. p. 294-296.
- METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; BUIM, M.R.; TIMENETSKY, J.; FERREIRA, A. J. P. Evaluation of a PCR multiplex for detection and differentiation of *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, and *M. gallisepticum* strain *F-vaccine*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 13-18, 2015.
- MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer flocks. **Avian Diseases**, v. 31, n. 3, p. 477-482, 1987.
- MORENO, A. M. Técnicas moleculares de diagnóstico. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. E ORGANIZADORES. **Patologia Aviária**. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, p. 510, 2009.
- MUCH, P.; WINNER, F.; STIPKOVITS, L.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. *Mycoplasma gallisepticum*: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 181-186, 2002.
- MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, n. 9496, p.1561–1577, 2005.
- NASCIMENTO E. R.; YAMAMOTO R.; HERRICK K. R.; TAIT R. C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 35, n. 1, p. 62-69, 1991.
- NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F.; ARAUJO, L. M. G. Isolamento e classificação de *Mycoplasma gallisepticum* em aves. **XVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Camboriú, SC. Brasil. p. 76, 1982^a.
- NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. **Doenças das Aves**, Campinas: FACTA, p. 485-500, 2009.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F.; BARRETO, M. L. Avian Mycoplasmosis Update. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 1, p. 01-09, 2005.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; DAMASSA, A. J.; ORTMAYER, H. B.; NASCIMENTO, M. G. F. PCR versus isolamento e sorologia no diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas e perus. **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Santos, SP. Brasil. p. 89-90, 1994.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M. I. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. **Avian diseases**. v. 37, n. 1, p. 203-211, 1993.

NOLI, C. Leishmaniosis Canina Waltham International focus, London, v.9, n 2, 1999.

OLSON, N. O.; KERR, K. M.; CAMPBELL, A. Control of infectious synovitis. Preparation of an agglutination test antigen. **Avian Diseases**, v. 7, n. 3, p. 623-631. 1964.

OTRANTO, D.; TESTINI, G.; BUONAVOGLIA, C.; PARISI, A.; BRANDONISIO, O.; CIRCELLA, E.; DANTAS-TORRES, F.; CAMARDAA, A. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. **Acta Tropica**, v. 113, n. 1, p. 80–83, 2010.

PETERS, R. H. The ecological implications of body size. **Journal of Applied Ecology**, v. 22, n. 1, p. 291-292, 1983.

RACLOZ, V.; GRIOT, C. E.; STA, R. K. K. D. C. Sentinel surveillance systems with special focus on vector-borne diseases. **Animal Health Research Reviews**, v. 7, n. 1/2, p. 71-79, 2007.

RAMOS, C. S.; FRANCO, F. A.; SMITH, D. F.; ULIANA, S. R. Characterisation of a new *Leishmania* METAgene and genomic analysis of the METAcluster. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 213–219, 2004.

RANCK, M. F.; SCHMIDT, V.; PHILIPP, H. C.; VOSS, M.; KACZA, J.; RICHTER, A.; FEHLHABER, K.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. *Mycoplasma synoviae* associated egg-pole shell defects in laying hens. **Berliner und Münchenertierärztliche Wochenschrift**, v. 123, n. 3-4, p. 111-118, 2010.

- REISEN, W. K; et al. Repeated West Nile Virus Epidemic Transmission in Kern County, California, 2004–2007. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 1, p. 139–157, 2009.
- RODRIGUES, A. C.; DOS SANTOS, A. B.; FEITOSA, L. F.; SANTANA, C. S.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D. JR. Criação peridomiciliar de galináceos aumenta o risco de Leishmaniose visceral humana. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 12, p. 12-13, 1999.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunidade aos Protozoários e Vermes. São Paulo: Manole, p. 423, 1999.
- ROSÁRIO, E. Y.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.
- SCHALLING, H. D. F. H.; OSKAN, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of Leishmaniasis as parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641-651, 2002.
- SCHWARZ, A.; STERNBERG, J. M.; JOHNSTON, V.; MEDRANO-MERCADO, N.; ANDERSON, J. M.; HUME, J. C.; BILLINGSLEY, P. F. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. **International Journal of Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 1021-1029, 2009a.
- SERVICO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. (SEBRAE). **Cadeia produtiva da avicultura: cenários econômicos e estudos setoriais**, Recife, 2008.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.
- SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous Leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergin*. sp. A new Leishmanial parasite of man in the Amazon Region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.

- SILVEIRA, R. M.; FIORENTIN, L.; MARQUES, E. K. Polymerase chain reaction Optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Diagnosis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 218-222, 1996.
- SOARES, B. N. R. R. **Soroconversão de galinhas para antígenos salivares de *L. longipalpis*: possibilidade de uso como sentinela em área endêmica para Leishmaniose visceral**. 115f. Salvador, BA. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia – Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, 2012.
- STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1495-1525, 1996.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n. 5, p.951-958, 2002.
- TAVARES, C. A. P.; FERNANDES, A. P.; MELO, M. N. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 657-667, 2003.
- TAVARES, L. M. A.; TAVARES, E. D. Incidência distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 1, p. 47-52, 1999.
- TEODORO, U.; KÜHI, J. B.; SANTOS, D. R.; SANTOS, E. S. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotômíneos no sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.15, n. 4, p. 901-906, 1999.
- THOMÉ, S. M. G. Cuidados com as Leishmanioses. **Revista Cães e Gatos**. n. 85, p. 46-50, 1999.
- WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 113-130, 1995.
- WHITHEAR, K. Control of avian mycoplasmoses by vaccination. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1527-1553, 1996.
- WHO. Control of Leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization, Geneva. **Technical report, series 793**, 1996.
- WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4238-4244, 2000.

YAGIHASHI, T.; TAJIMA, M. Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 30, n. 3, p. 543-550, 1986.

YAMAMOTO, R. *Mycoplasma meleagridis* infection. In: Calneck BW, Johon Barnes H, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr HW, editors. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 449, 1994.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Detecção molecular de *Leishmania* spp. em granjas de poedeiras comerciais do Estado de Pernambuco¹

Marcus M.R. de Amorim², Mércia R Barros²

ABSTRACT.-Amorim M.M.R., Barros M.R. 2019.

[Molecular detection of *Leishmania* spp. in commercial laying hens from the state of Pernambuco.] **Detecção molecular de *Leishmania* spp. em granjas de poedeiras comerciais do Estado de Pernambuco.** *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: mercia.barros@ufrpe.br

Chickens can be used to assist in the monitoring or identification of outbreaks by infectious agents, investigation of changes in the incidence or prevalence of a particular disease, as well as in epidemiological control programs that can be applied in risk areas. The objective of this work was to detect the presence of *Leishmania* spp. in the blood of commercial poultry farms in the state of Pernambuco. Samples were collected at commercial laying hens farm, where two collections of different flocks and ages were made per establishment. Six laying hens' flocks were sampled from three commercial farms in the State of Pernambuco. For the study, 120 blood samples plus Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were collected. The blood of the birds was submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR). Of the total samples submitted to PCR, none showed positivity for *Leishmania* spp. In the questionnaires carried out, other species of animals were observed in the six sampled flocks, being wild birds and rats present in all flocks and dogs and cattle in two flocks. As far as manure was concerned, all the farms carried out the removal when it reached the height of the cages (Californian type aviaries), except for the automated shed in which the feces were separated by automatic mats. No farm does manure treatment. Many flies and mosquitoes were reported in the surroundings and inside the aviaries, not being able to report the presence of mosquitoes inside the aviaries during the night period. All farms carried out control of flies and mosquitoes through chemical control, by the application of adulticides and larvicides. The present study did not obtain positive results in the PCR for *Leishmania* spp. However, based on the research questionnaires carried out on the farms, we could observe the presence of several vector attraction factors, being important new researches on the role of commercial poultry production in the epidemiology of Leishmaniasis.

INDEX TERMS: Leishmaniosis, poultry production, commercial laying hens, PCR.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Pesquisa de iniciação científica.

*Autor para correspondência: mercia.barros@ufrpe.br

RESUMO.- As galinhas podem ser utilizadas no auxílio do monitoramento ou identificação de surtos causados por agentes infecciosos, investigação das mudanças na prevalência ou incidência de uma determinada doença, além de avaliar a eficácia de programas de controle epidemiológico instituído em determinada área. Objetivou-se com este trabalho detectar molecularmente a presença de *Leishmania* spp. no sangue de poedeiras comerciais de granjas avícolas do Estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas em estabelecimentos de produção comercial de poedeiras comerciais, onde foi realizada duas coletas de diferentes lotes e idades por estabelecimento. Foram amostrados seis lotes oriundos de três granjas de poedeiras comerciais localizadas no Estado de Pernambuco. Para realização do estudo foram coletadas 120 amostras de sangue acrescido de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O sangue das aves foi submetido a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Do total de amostras submetidas a PCR, nenhuma apresentou positividade para *Leishmania* spp. Nos questionários investigativos realizados, nos seis lotes amostrados, já foram observadas outras espécies de animais, sendo aves silvestres e ratos presentes em todos os lotes e cães e bovinos em dois lotes. Em relação ao esterco, todas as granjas com

aviários do tipo californiano realizavam a retirada quando o mesmo chegava próximo à altura das gaiolas, o lote oriundo de galpão automatizado as fezes eram separadas por esteiras automáticas. Entretanto, em nenhuma granja era realizado o tratamento do esterco. Em todos os lotes havia grande presença de moscas e mosquitos nos arredores e no interior dos aviários, mas, não souberam relatar sobre a presença de mosquitos no interior dos aviários durante o período noturno. Todas as granjas realizavam o controle de moscas e mosquitos através do controle químico, pela aplicação de produtos aduicidas e larvicidas. O presente estudo não obteve resultados positivos na PCR para *Leishmania* spp. Contudo, com base nos questionários investigativos realizados nas granjas pode-se observar a presença de vários fatores de atração do vetor, sendo importante o aprofundamento sobre o papel da criação comercial de aves na epidemiologia da Leishmaniose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leishmaniose, avicultura, poedeiras comerciais, PCR.

INTRODUÇÃO

A avicultura de Pernambuco é uma cadeia bastante consolidada que atende as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o que a habilita para a comercialização nos mercados nacional e internacional, demonstrando a importância de pesquisas sobre fatores que possam influenciar negativamente a indústria avícola, seja de saúde animal ou saúde pública (Sebrae 2008).

A importância das Leishmanioses se observa nas consequências que produzem na saúde pública devido à alta letalidade, incidência e implicações econômico-sociais que ocorrem pela debilitação do trabalhador (Boraschi & Nunes 2007).

Atualmente a enfermidade passa por um processo de urbanização, apesar de ocorrer primariamente em meio rural (Brasil 2004). O Nordeste, entre as diversas áreas da Federação Brasileira, é a região que detém a maior parte dos casos humanos (Tavares & Tavares 1999), sendo sua ocorrência relacionada com problemas sanitários e à subnutrição (Alves & Faustino 2005), além presença do reservatório canino e da alta densidade do vetor (Badaró et al. 1996).

As galinhas também podem ser utilizadas auxiliando o monitoramento ou identificação de surtos causados por agentes infecciosos, na investigação de incidência ou prevalência de uma determinada doença, além de avaliar a eficácia de programas de controle epidemiológico instituído em determinada área (Racloz et al. 2007).

Tendo em vista a representatividade econômica da avicultura para o Brasil, objetivou-se com este trabalho detectar molecularmente a presença de *Leishmania* spp., no sangue de poedeiras comerciais de granjas avícolas do Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais e amostragem. Os estabelecimentos produtores de poedeiras comerciais foram utilizados para realização da colheita do material biológico, onde foram realizadas duas coletas de diferentes lotes por estabelecimento. Foram amostrados seis lotes oriundos de três granjas de poedeiras comerciais localizadas no Estado de Pernambuco. A amostragem utilizada neste estudo foi do tipo não probabilístico por conveniência (Sampaio 1998). O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE) com licença de nº 093/2017.

Questionário investigativo. Foi realizado para obtenção de informações sobre o lote, abordando a presença de outras espécies na propriedade, como e quando era realizada a retirada e tratamento do esterco, o tipo de aviário, a presença de moscas e mosquitos nos arredores e interior do aviário, presença de mosquitos no interior do aviário no período da noite e como era realizado o controle de insetos.

Colheita de amostras e processamento. Para realização do estudo foram colhidas 120 amostras de sangue acrescido de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram obtidas pela punção da veia braquial, sendo colhidos aproximadamente 3mL de sangue de cada ave. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias e Laboratório de Doenças Infecto contagiosas (LDIC) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Diagnóstico molecular. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o “kit” comercial Wizzard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers MC1: (5’ - GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG - 3’) e MC2: (5’CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG - 3’), descritos por Cortes et al. (2004), que permite a amplificação de 447pb do DNA. As reações de PCR constaram de 2,5µL de água ultrapura (Milli-Q), 12,5µL de Master Mix, 2,5µL de cada “primer” (10pmol) e 5µL do DNA extraído, obtendo um volume final

de 25µL. O controle positivo consistiu de DNA extraído a partir de medula óssea de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum*, e para o controle negativo, foi utilizada água ultra-pura. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo 94°C – 5 min, 65°C – 1 min e 72°C – 1min; e 29 ciclos: 94°C – 1 min, 60 °C – 20 seg, 72°C – 30 seg, seguidos de uma extensão final 72°C – 5 min. Posteriormente foi realizada a transferência de 9µl do produto de DNA amplificado, adicionado de 0,5µl de Bluegreen® e 1µl de Tampão em gel de agarose a 2% e submetidas às condições de eletroforese sob luz ultravioleta e fotodocumentado pelo sistema de documentação de gel, e como marcador de peso molecular utilizou-se Ladder® de 100pb.

RESULTADOS

Do total de amostras submetidas a PCR, nenhuma apresentou positividade para *Leishmania* spp. Nos questionários investigativos realizados nos lotes amostrados, foram observadas outras espécies de animais, sendo aves silvestres e ratos presentes em todos os lotes, e cães e bovinos em dois lotes. Em relação ao esterco, todas as granjas com aviários do tipo californiano realizavam a retirada quando o mesmo chegava próximo à altura das gaiolas, e no lote oriundo de galpão automatizado as fezes eram separadas por esteiras automáticas. Entretanto, em nenhuma granja era realizado o tratamento do esterco. Em todos os lotes havia grande presença de moscas e mosquitos nos arredores e no interior dos aviários, mas, não souberam relatar a presença de mosquitos no interior dos aviários durante o período noturno. Todas as granjas realizavam o controle de moscas e mosquitos através do controle químico, pela aplicação de produtos adulticidas e larvicidas.

DISCUSSÃO

A presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue de aves poderia indicar a presença do vetor infectado com o patógeno, caracterizando o papel da galinha como indicador biológico da enfermidade. Contudo, a PCR de sangue total não foi capaz de detectar DNA de *Leishmania* spp., seja por conta das características fisiológicas das aves, que dificultam a persistência da infecção ou pelo fato destas não terem sido expostas ao protozoário. Segundo Zilberstein & Shapira (1994), as aves apresentam características fisiológicas como a temperatura corporal de 41,0°C e a atividade do sistema complemento que impede o seu desenvolvimento e a manutenção de infecções por *Leishmania* spp., por um período prolongado.

Otranto et al. (2010) em estudo experimental de inoculação de *Leishmania infantum* no subcutâneo de galinhas observou positividade ao DNA de *L. infantum* em amostras de pele, medula óssea, fígado e baço por meio da PCR convencional e qPCR indicando a presença do parasita não apenas no local da inoculação (pele), mas também em outros tecidos. Contudo, os autores não conseguiram detectar anticorpos *anti-Leishmania* spp., no sangue das aves, afirmando que as aves são de fato refratárias a infecção.

Por outro lado, outras ferramentas de diagnóstico que se baseiem na detecção de substâncias relacionadas à saliva do vetor podem ser utilizadas para estudo do papel da galinha como sentinela da *Leishmania* spp. Atualmente já se sabe que aves expostas a picadas de artrópodes hematófagos desenvolvem anticorpos contra componentes da saliva desses vetores (Schwarz et al. 2009a). Segundo Soares (2012), a galinha (*Gallus gallus*) é capaz de desenvolver anticorpos IgY anti-SGS e anti-proteínas recombinantes da saliva de *L. longipalpis*, sugerindo que estes animais podem ser considerados como sentinelas para detectar a presença destes vetores em área endêmica para Leishmaniose Visceral (LV). A autora afirma que a utilização da proteína recombinante LJM11 traz como perspectiva a sua utilização para monitoramento de áreas de risco, sendo considerada uma ferramenta de alerta sobre o risco de exposição ao flebotômio *L. longipalpis* e consequente risco para a transmissão da LV.

Em áreas onde a LV é endêmica, os cães são os mais importantes reservatórios de *L. infantum*, atuando como uma fonte de infecção prontamente disponível para os vetores (Ashford, 1996; Dantas Torres 2007). Atualmente, é conhecida uma variedade de animais que já foram identificados como fontes alimentares de flebotômios (Tesh et al. 1971; Christensen et al. 1982). As combinações nas alimentações sanguíneas relatadas por diversos autores apontam que frequentemente o sangue de aves é encontrado no conteúdo estomacal destes insetos (Dias, Loroza & Rebêlo 2003), porém a preferência alimentar por aves bem como o seu papel na cadeia de transmissão da doença ainda não é bem esclarecida (Alexander et al. 2002). Além disso, espécies sinantrópicas que invadem galinheiros, como a raposa (*Cerdocyonthus*), o gambá (*Didelphis albiventris*) e o rato preto (*Rattus rattus*), são potenciais reservatórios de *L. infantum* (Sherlock 1996).

A relação entre galinhas e os flebotomos já havia sido verificada por Teodoro et al. (1999), quando observaram que o galinheiro se mostra bastante atrativo para o *L. longipalpis*, encontrando neste local matéria orgânica úmida e abundância de alimento. Isso significa que as galinhas têm realmente um papel na epidemiologia da Leishmaniose visceral zoonótica, não como hospedeiros de *Leishmania* spp., mas

como um fator de risco para a presença de flebotômíneos perto de habitações humanas (Caldas et al. 2002).

Sabe-se que uma série de fatores pode favorecer a alimentação de flebotômíneos em sangue de galinha. As aves possuem áreas de exposição como cristas e barbelas (ricas em capilares), a epiderme mais fina facilitando a alimentação destes insetos, além do baixo nível sérico de hemoglobina e inatividade das galinhas durante o período da noite (Freeman et al. 1984; Alexander et al. 2002). Portanto, as galinhas são relevantes como fator de atração, inicialmente de machos, os quais são atraídos para o local de alimentação e liberando feromônios, que são volatilizados de forma mais eficaz por conta da alta temperatura corporal e da alta emissão de CO₂ por parte das aves, auxiliando na orientação de fêmeas para repasto sanguíneo e posterior reprodução (Peters et al. 1983; Bray et al. 2010).

O fato é que os aviários comerciais podem fornecer um refúgio e/ou um local de reprodução para algumas espécies de flebotômíneos (Lane 1986) destacando a importância de desenvolver programas de controle de vetores em áreas onde a Leishmaniose visceral zoonótica é endêmica (Otranto et al. 2010).

CONCLUSÃO

Com base nos questionários investigativos realizados nas granjas pode-se observar a presença de vários fatores de atração do vetor, sendo importante o aprofundamento sobre o papel da criação comercial de aves na epidemiologia da Leishmaniose.

REFERÊNCIA

- Alexandre B., De Carvalho R.L., Mccallum H., Pereira M.H. 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 8(12):1480-1485.
- Alves L.C., Faustino M.A.G. 2005. Leishmaniose visceral canina Manual da Schering Plough. p. 14, 2005.
- Badaró R., Benson D., Eulalio M.C. 1996. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Disease*, 73(3):758-761.
- Boraschi C.S.S., Nunes C.M. 2007. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Clínica Veterinária*. 71(1):44-48.
- Brasil. 2004. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, DF.
- Bray D.P., Alves G.B., Dorval M.E., Brazil R.P. & Hamilton J.G. 2010. Research Synthetic sex pheromone attracts the Leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpisto* experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasites & Vectors*. 3(1):16.
- Caldas A.D.J.M., Costa J.M.L., Silva A.A.M.D., Vinhas V. & Barral A. 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*. 96(1):21-28.
- Christensen H.A., Arias J.R., Vasquez A.M., Freitas R.A. 1982. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Central Amazon of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 31(2): 239-242.
- Cortes S., Rolao N., Ramada J., Campino L. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine Leishmaniasis using *Leishmania donovani*.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*. 98(1):12-17.
- DantasTorres F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*. 149(3-4):139-146.
- Dias F.O.P., Lorosa E.S. & Rebêlo J.M.M. 2003. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (*Psychodidae, Phlebotominae*). *Cadernos de Saúde Pública*. 16(1):217-218.
- Freeman B.M. 1984. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London: Academ Press.
- Lane R.P. 1986. Chicken house reservoirs of sandflies. *Parasitology Today (Personal ed.)*. 2(9):248-249.
- Otranto D., Testini G., Buonavogliaa C., Parisi A., Brandonisioc O., Circella E., Dantas-Torres F. & Camardaa A. 2010. Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. *Acta Tropica*. 113(1):80-83.
- Peters R.H. 1986. *The ecological implications of body size*. Cambridge (MA): Cambridge University Press.
- Racloz V., Griot C.E. & Sta R.K.K.D.C. 2006. Sentinel surveillance systems with special focus on vector-borne diseases. *Animal Health Research Reviews*. 7(1-2):71-79.
- Schwarz A., Sternberg J.M., Johnston V., Medrano-Mercado N. Anderson J.M., Hume J.C. & Billingsley P.F. 2009a. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *International Journal of Parasitology*. 39(9):1021-1029.

- Serviço Brasileiro de Apoio as Micros e Pequenas Empresas (SEBRAE). 2008. Cadeia produtiva da avicultura: cenários econômicos e estudos setoriais.
- Sherlock I.A. 1996. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91(6):671-683.
- Soares B.N.R.R. 2012. Soroconversão de galinhas para antígenos salivares de *L. Longipalpis*: possibilidade de uso como sentinela em área endêmica para Leishmaniose visceral. 61f. Salvador, Bahia. Tese de Doutorado, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.
- Tavares L.M.A. & Tavares E.D. 1999. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose visceral em Sergipe. *Informe Epidemiológico do SUS*. 8(1):47-52.
- Teodoro U., Kuhl J.B., Santos D.R. & Santos E.S. 1999. Impacto de alterações ambientais na ecologia de flebotomíneos no sul do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 15(4): 901-906.
- Tesh R.B., Chaniotis B.N., Aronson M.D. & Johnson K.M. 1971. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sand flies as determined by precipitin test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 20(1):150-156.
- Zilberstein D. & Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Reviews in Microbiology*. 48(1):449.

5.2 Artigo 2

Diagnóstico sorológico e molecular da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em granjas avícolas do Estado de Pernambuco¹

Marcus M.R. de Amorim², Mércia R. Barros²

ABSTRACT.-Amorim M.M.R., Barros M.R. 2019.

[Diagnosis and epidemiological evaluation of *Mycoplasmaspp* infection in poultry farms from the state of Pernambuco.] Diagnóstico sorológico e molecular da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em granjas avícolas do Estado de Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: mercia.barros@ufrpe.br

The objective of this study was to serologically and molecularly diagnose *Mycoplasma* spp. infection in broiler and commercial laying hens from poultry farms in the State of Pernambuco. 344 blood serum samples, 220 tracheal swab samples and 67 tracheal samples were collected. Serum samples were subjected to Rapid Serum Agglutination (SAR), Hemagglutination Inhibition (HI) and Enzyme Immunoabsorption Assay (ELISA), and trachea and tracheal swabs were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR), Nested PCR and MG-F vaccine PCR. At SAR (1:10 dilution), 14.82% (51/344) of the samples were positive for MG, whereas 28.49% (98/344) samples were positive for MS. In the HI test, 8.72% (30/344) and 20.35% (70/344) were positive for MG and MS, respectively. In ELISA, 45.64% (177/344) presented seropositivity for MG and 57.26% (189/344) for MS. Of the trachea and trachea swab samples submitted to PCR, 25.9% (57/220) and 42.27% (31/67) were positive for MG, respectively. 10% (22/220) of the tracheal swab specimens, while 18.2% (12/66) of the trachea had MS positivity. In the vaccine PCR, 56.14% (32/57) of the MG tracheal swab samples were from the MG-F strain, whereas 40.62% (13/32) of the positive trachea were vaccine strains. The importance of the use of serological and molecular tools in the diagnosis of micoplasmosis was observed, as it was possible to detect the DNA of the agent in flocks that did not seroconverted in the serological tests and vice versa. In addition to conventional PCR, the vaccine differentiation PCR is fundamental because of the ability to detect different strains in a flock of birds.

INDEX TERMS: Laying hens, broilers chickens, *Mycoplasma* spp., serology, PCR.

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Pesquisa de iniciação científica.

*Autor para correspondência: mercia.barros@ufrpe.br

RESUMO.-Objetivou-se com este estudo diagnosticar sorologicamente e molecularmente a infecção por *Mycoplasma* spp. em poedeiras comerciais e frangos de corte de granjas avícolas do Estado de Pernambuco. Foram 344 amostras de soro sanguíneo, 220 amostras de suabe traqueal e 67 amostras de traqueia. As amostras de soro foram submetidas às técnicas de soroaglutinação rápida (SAR), Inibição da Hemaglutinação (HI) e Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), e os suabes de traqueia e traqueia foram submetidos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR Nested e PCR vacinal. Na diluição de 1:10 na SAR, para MG 14,82% (51/344) foram positivas, enquanto que para MS 28,49% (98/344). No teste de HI foram positivos para MG e MS, 8,72% (30/344) e 20,35% (70/344), respectivamente. No ELISA, apresentaram soropositividade para MG 45,64% (177/344) e para MS 57,26% (189/344). Das amostras de suabe de traqueia e traqueia submetidas a PCR, 25,9% (57/220) e 42,27% (31/67) foram positivas para MG, respectivamente. Das amostras de suabe de traqueia e amostras de traqueia, 10% (22/220) e 18,2% (12/66) foram positivas para MS, respectivamente. Na PCR vacinal, 56,14% (32/57) das amostras de suabe de traqueia positivas para MG foram oriundas da cepa vacinal MG-F, enquanto que das traqueias

40,62% (13/32) foram positivas para a cepa vacinal. Percebe-se a importância do uso de ferramentas sorológicas e moleculares no diagnóstico de MG e MS, visto que foi possível detectar o DNA do agente em lotes que não apresentaram soroconversão nos testes sorológicos e vice e versa. Além da PCR convencional, a PCR de diferenciação de cepas de campo e de cepa vacinal, se mostra fundamental por conta da capacidade de detectar diferentes cepas em um lote de aves.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Poedeiras comerciais, frangos de corte, *Mycoplasma* spp., sorologia, PCR.

INTRODUÇÃO

O processo de intensificação da atividade avícola pode favorecer a ocorrência e disseminação de patógenos infecciosos, principalmente os relacionados com o trato respiratório (Minharro et al. 2001).

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é o agente etiológico da doença crônica respiratória (DCR) e pode causar sinais clínicos variados como dificuldade respiratória, secreção nasal, sinusite, aerossaculite, diminuição da produção de ovos e aumento da mortalidade embrionária (Mohammed et al., 1987), sendo também relatadas redução do ganho de peso e a degradação da qualidade da carcaça em frangos de corte (Stipkovits & Kempf 1996, Bradbury 2007).

O *Mycoplasma synoviae* (MS) pode causar problemas respiratórios semelhantes ao MG e afetar a qualidade da casca do ovo com anormalidades típicas no ápice da casca (EAA) e diminuição da produção (Feberwee et al. 2009, Catania et al. 2010, Ranck et al. 2010).

Para confirmação da infecção por micoplasma é necessário a realização do diagnóstico epidemiológico, clínico e anatomopatológico, com confirmação por meio de exames laboratoriais, detectando-se a presença de anticorpos e/ou do agente (Charlton et al. 1996).

Tendo em vista a representatividade econômica da avicultura para o Brasil, objetivou-se com este estudo diagnosticar sorologicamente e molecularmente a infecção por *Mycoplasma* spp. em poedeiras comerciais e frangos de corte de granjas avícolas do Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais e colheita de amostras. Os estabelecimentos de produção de poedeiras comerciais e de frangos de corte foram utilizados para realização da colheita de amostras biológicas, onde foi realizada uma ou mais colheitas de diferentes lotes por estabelecimento. Foram amostrados 22 lotes oriundos de nove granjas, sendo seis de criações de poedeiras comerciais e três de frangos de corte localizadas no Estado de Pernambuco. As informações obtidas por meio de questionário investigativo como idade do lote, sinais clínicos e uso de vacina contra MG estão descritas na Tabela 1. A amostragem utilizada neste estudo foi do tipo não probabilística por conveniência (Sampaio 1998). O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE) com licença de nº 093/2017.

Para realização do estudo foram coletadas 344 amostras de sangue para obtenção de soro sanguíneo, 220 amostras de suabe de traqueia e 66 amostras de traqueia. As amostras de soro foram obtidas pela punção da veia braquial, sendo colhido aproximadamente 3mL de sangue de cada ave. Para colheita dos suabes de traqueia, um suabe estéril foi introduzido na traqueia da ave e realizado movimentos rotacionais. Em torno de uma a cinco aves, aproximadamente, foram eutanasiadas de acordo com a Resolução N°1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) para colheita da traqueia, a qual foi acondicionada em PBS com glicerol a 10%. Todas as amostras biológicas foram mantidas em caixas isotérmicas sob refrigeração e transportadas para realização das análises sorológicas e moleculares. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Tabela 1. Composição e amostragem dos lotes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).

Granja	Tipo	Lote	Idade	Sinais clínicos*	Vacina contra MG	Número de amostras		
						Soro	Suabe de traqueia	Traqueia
A	PC	A1	16 sem	NÃO	SIM	12	10	05
		A2	08 sem	NÃO		11	10	05
		B1	18 sem	NÃO		09	10	05
B	PC	B2	9 sem	NÃO	SIM	12	10	05
		B3	20 sem	SIM		20	10	02

		B4	34 sem	SIM		20	10	02
C	PC	C1	9 sem	NÃO	SIM	11	10	05
		C2	16 sem	NÃO		10	10	05
		C3	29 sem	SIM		20	10	02
		C4	54 sem	SIM		20	10	01
D	PC	D1	16 sem	NÃO	NÃO	12	10	01
		D2	20 sem	NÃO		12	10	01
		D3	90 sem	SIM		20	10	03
		D4	29 sem	NÃO		20	10	02
E	PC	E1	63 sem	SIM	SIM	20	10	02
F	PC	F1	36 sem	NÃO	NÃO	20	10	02
		F2	84 sem	NÃO		20	10	02
G	FC	G1	40 dias	NÃO	NÃO	11	10	04
		G2	47 dias	NÃO		12	10	06
H	FC	H1	47 dias	NÃO	NÃO	12	10	03
I	FC	I1	45 dias	NÃO	NÃO	20	10	02
		I2	49 dias	NÃO		20	10	01

*Queda na produção de ovos e/ou estertores traqueais, cabeça inchada, sonolência, secreção nasal, espirros e dificuldade respiratória.

Soro Aglutinação Rápida - SAR. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) seguiram as técnicas recomendadas pelo PNSA (Brasil 2001). Para realização do teste, das 344 amostras de soro utilizou-se antígeno comercial (INATA®) para MG e MS. Foram adicionadas e posteriormente homogeneizadas partes iguais de antígeno e soro (1:1) e após três minutos foi verificada a presença ou não de aglutinação (complexo antígeno-anticorpo). Os soros positivos foram diluídos a partir de soro bruto na proporção de 1:5 e 1:10 em solução salina a 0,85% de NaCl. Foram considerados positivos para MG e MS os soros que apresentaram aglutinação na diluição 1:10 na SAR (Brasil 1994).

Inibição da Hemaglutinação - HI. Inicialmente foi obtido sangue de galinhas não vacinadas e posteriormente foi feita a papa de hemácias, a partir da diluição de 1:1 de sangue com solução anticoagulante (Elsever) e então centrifugada (1200 RPM) e em seguida lavada três vezes com PBS. Essa solução foi então diluída com PBS até obtenção da concentração de 1% de hemácias. Para realização do HI foram utilizados antígenos comerciais (INATA®) de MG e MS. Para definição do título hemaglutinante do antígeno concentrado e a realização do teste de HI, seguiu-se as recomendações do fabricante. Após 90 minutos em temperatura ambiente foi feita a leitura das placas, considerando positivas as amostras que apresentaram “efeito de lágrima” (escorrimento do botão de hemácias) a partir da titulação de 1:80.

Ensaio de Imunoabsorção enzimática - ELISA. Foi utilizado o kit Flock Chek Idexx® para detecção de anticorpos contra MG e MS de 344 amostras de soro, seguindo as orientações do fabricante: 100µL de cada amostra diluída (1:500) foram adicionados aos poços e incubadas em temperatura ambiente (18 a 26°C) por 30 minutos. Os poços foram então lavados com água destilada (3 a 5 lavagens). Posteriormente, foi adicionado a cada poço 100µL de conjugado de anticorpo Anti-galinha/Anti-peru marcado com HRPO e incubadas (18 a 26°C) por 30 minutos. Cada poço foi então lavado com água destilada (3 a 5 lavagens) e foram adicionados 100µL de substrato cromogênico de Tetrametilbenzidina (TMB) e incubados por 15 minutos (18 a 26°C). Após a reação foi finalizada com 100µL da solução de interrupção. A absorbância foi medida a 650nm e o ponto de corte do ELISA para considerar amostras reagentes e não reagentes, a média geométrica dos títulos (GMT) e as demais variáveis estatísticas, coeficiente de variação (CV), desvio padrão (DP), valores máximos e mínimos, foram calculados pelo software xCheck versão 3.3 da Idexx®.

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. Realizou-se inicialmente a extração de DNA dos suabes de traqueia e traqueia com o “kit” comercial Wizzard® Genomic DNA Purification (Promega®) utilizando protocolo do fabricante. Posteriormente, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos (Tabela 2) para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e cepa vacinal (MG-F).

As reações de PCR constaram de 2,75µL de água ultrapura (Milli-Q), 6,25µL de Master Mix, 0,5µL de cada “primer” (20pmol) e 2,5µL do DNA extraído, obtendo um volume final de 12,5µL. Como controle positivo utilizou-se cepas *American Type Culture Collection* de MG (ATCC 19610) e MS (ATCC 116 25204), e para controle negativo foi utilizado água ultrapura. O perfil térmico das reações seguiu metodologia preconizada por Buim et al. (2009), em que ocorreu um pré-aquecimento a 94°C por 5 min, seguido de 35

ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min, acrescida da extensão final a 72°C por 10 min e resfriamento a 4°C por 5 min. Posteriormente foi realizada a transferência de 6µl do produto de DNA amplificado, adicionado de 0,5µl de *Bluegreen*® e 1µl de Tampão em gel de agarose a 1,5% ou 2% e submetidas às condições de eletroforese sob luz ultravioleta e fotodocumentado pelo sistema de documentação de gel. Utilizou-se o marcador de peso molecular 100pb *Ladder*®.

PCR Nested. Foram utilizados os amplicons da reação anterior, usando primers MG-PCR. A reação foi padronizada para um volume final de 12,5µL por microtubo, contendo 2,75µL de água ultrapura (Milli-Q), 6,25µL de Master Mix, 0,5µL de cada “primer” (10pmol) e 2,5µL do amplicon. O perfil térmico das reações seguiu metodologia preconizada por Buim et al. (2009). Em seguida, 6µL da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com *BlueGreen*®, visualizados e fotografados em fotodocumentador com luz ultravioleta.

PCR Vacinal. Após a detecção do DNA de MG na PCR convencional e PCR Nested, as amostras positivas foram submetidas a PCR para diferenciação da cepa de campo com a cepa vacinal. As reações de PCR constaram de 2,75µL de água ultrapura (Milli-Q), 6,25µL de Master Mix, 0,5µL de cada “primer” (30pmol) e 2,5µL do DNA extraído, obtendo um volume final de 12,5µL. Como controle positivo utilizou-se o DNA da cepa vacinal (Conn-F) e para controle negativo foi utilizado água ultra pura. O perfil térmico das reações seguiu metodologia preconizada por Buim et al. (2009). Por último foi realizada a transferência de 6µl do produto de DNA amplificado, adicionado de 0,5µl de *Bluegreen*® e 1µl de Tampão para gel de agarose a 1,5% e submetidas às condições de eletroforese sob luz ultravioleta e fotodocumentado pelo sistema de documentação de gel.

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de PCR para detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e cepa vacinal MG-F.

Primers ^a	Sequência (5' - 3')	Produto	Referência
MG-F	GGATCCCATCTCGACCACGAGAAAA	732 pb	Nascimento <i>et al.</i> (1991)
MG-R	CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA		
MGF-F	TAACCCTTCATCACCTCATCTAGAG	524 pb	Nascimento <i>et al.</i> (1993)
MGF-R	CTGTTTGCTAAAGAACAAGTTGATC		
MS-F	GAGAAGCAAAATAGTGATATCA	207 pb	Lauermanet <i>al.</i> (1998)
MS-R	CAGTCGTCTCCGAAGTTAAACA		
MG ^F -PCR	CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC	481 pb	Nascimento <i>et al.</i> (2005)
MG ^R -PCR	GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT		

^aF= Forward, R = Reverse.

Análise estatística. O coeficiente *Kappa* foi utilizado como teste de concordância, com os seguintes valores convencionais de interpretação: (<0,20=concordância pobre; 0,21-0,40=concordância fraca; 0,41-0,60=concordância moderada; 0,61-0,80=concordância boa e >0,80=concordância muito boa). Valores negativos foram interpretados como equivalentes a 0,0. O teste qui-quadrado foi usado para determinar associações entre os materiais biológicos (Landis & Koch 1977).

RESULTADOS

A relação dos resultados de cada teste sorológico por lote está descrita na Tabela 3. Na SAR (diluição de 1:1), 23,5% (81/344) foram positivas para MG e 41,57% (143/344) para MS. Na diluição de 1:10, 14,82% (51/344) foram positivas para MG, enquanto que 28,49% (98/344) para MS. Nos lotes com histórico de sinais clínicos respiratórios ou queda na produção, 33,33% (40/120) de amostras foram positivas para MG e 55% (66/120) para MS na diluição de 1:10. Nos lotes sem histórico clínico respiratório e/ou queda na produção, 4,91% (11/224) das amostras na SAR foram positivas para MG e 14,28% (32/224) para MS.

No teste de HI, 8,72% (30/344) e 20,35% (70/344) foram positivos para MG e MS, respectivamente. Em lotes vacinados para MG foi detectado soro prevalência de 14,63% (30/205) para MG. Os lotes com histórico de sinais clínicos apresentaram positividade de 23,33% (28/120) para MG e 57,5% (69/120) para MS. Nos lotes sem histórico clínico respiratório e/ou queda na produção, 0,89% (2/224) das amostras foram positivas no HI para MG e 0,44% (1/224) para MS.

E no ELISA, 45,64% (177/344) apresentaram soropositividade para MG e 57,26% (189/344) para MS. Do total de aves vacinadas, 69,69% (115/165) amostras apresentaram sororeatividade para MG. Nos lotes com histórico de sinais clínicos respiratórios ou queda na produção, observou positividade de 93,33%

(112/120) para MG e 97,5% (117/120) para MS. Nos lotes sem histórico clínico respiratório e/ou queda na produção, 29% (65/224) das amostras foram positivas no ELISA para MG e 32,14% (72/224) para MS.

A SAR, HI e ELISA foram submetidos ao teste de concordância Kappa, e os resultados estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Utilização de diferentes testes sorológicos para detecção de anticorpos contra MG e MS provenientes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).

Granja	Lote	Sinais clínicos	Vacina contra MG	SAR (1:10)		HI		ELISA	
				MG	MS	MG	MS	MG	MS
A	A1	NÃO	SIM	0%	0%	0%	0%	83,3%	8,3%
	A2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	72,7%
B	B1	NÃO	SIM	0%	0%	22,2%	11,1%	77,8%	88,9%
	B2	NÃO		0%	8,33%	0%	0%	41,7%	8,3%
	B3	SIM		5%	5%	0%	5%	100%	100%
	B4	SIM		40%	0%	5%	70%	95%	100%
C	C1	NÃO	SIM	9,1%	0%	0%	0%	9,09%	9,1%
	C2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	40%
	C3	SIM		50%	40%	50%	10%	85%	85%
	C4	SIM		100%	100%	55%	50%	100%	100%
D	D1	NÃO	NÃO	100%	0%	0%	0%	33,3%	50%
	D2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	25%
	D3	SIM		0%	95%	15%	75%	100%	100%
	D4	NÃO		0%	0%	5%	0%	45%	45%
E	E1	SIM	SIM	5%	90%	0%	0%	80%	100%
F	F1	NÃO	NÃO	0%	55%	10%	35%	45%	55%
	F2	NÃO		0%	100%	0%	100%	100%	100%
G	G1	NÃO	NÃO	0%	0%	0%	0%	0%	9,1%
	G2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	0%
H	H1	NÃO	NÃO	0%	0%	0%	0%	0%	0%
I	I1	NÃO	NÃO	0%	0%	0%	0%	0%	30%
	I2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	5%

A-F: Poedeiras comerciais; G-I: Frangos de corte.

Tabela 4. Resultado da concordância Kappa entre os testes sorológicos utilizando a SAR como teste base.

Técnica/Agente	Parâmetros		
	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
HI			
MG	52,6%	91,5%	0,48
MS	71,6%	95%	0,59
ELISA			
MG	92,1%	72,6%	0,57
MS	93,8%	50%	0,48

Das amostras de suabe de traqueia e traqueia submetidas a PCR convencional, 10% (22/220) e 24,24% (16/66) foram positivas para MG na PCR convencional, respectivamente. Na PCR Nested, 25,45% (56/220) das amostras de suabe de traqueia e 46,97% (31/66) das amostras de traqueia foram positivas para MG. Enquanto que 10% (22/220) das amostras de suabe de traqueia e 18,2% (12/66) de traqueia apresentaram positividade para MS, todas provenientes de aves poedeiras comerciais. Os resultados por lote estão descritos na tabela 5.

Nos lotes com histórico clínico respiratório e/ou queda de produção, 40% (24/60) e 68,7% (8/12) foram positivas para MG nas amostras de suabe de traqueia e traqueia, respectivamente. Nos lotes sem clínica, 20% (32/160) das amostras de suabe de traqueia e 50% (24/48) de traqueia foram positivas para MG. Para MS, 11,67% (7/60) das amostras de suabe de traqueia e 58,33% (7/12) de traqueia de lotes com histórico clínico foram positivas, já em lotes sem histórico clínico, 9,4% (15/160) das amostras de suabe de traqueia e 8,33% (5/60) de traqueia foram positivas para MS.

Em relação ao tipo de material biológico utilizado para a realização da PCR foi observada uma maior eficácia de detecção de MG nas amostras de traqueia do que nos suabes de traqueia ($p=0,001475$). Enquanto para detecção de MS não foi visto diferença significativa entre os materiais biológicos ($p=0,113$).

Tabela 5. Detecção por meio de PCR convencional e PCR Nested de MG e PCR convencional para MS de amostras de suabe de traqueia e traqueia provenientes de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC).

Granja	Lote	Sinais clínicos	Vacina contra MG	PCR MG		PCR MG Nested		PCR MS	
				Suabe	Traqueia	Suabe	Traqueia	Suabe	Traqueia
A	A1	NÃO	SIM	20%	0%	0%	0%	0%	0%
	A2	NÃO		10%	0%	20%	0%	0%	0%
B	B1	NÃO	SIM	20%	20%	20%	50%	0%	0%
	B2	NÃO		0%	60%	10%	60%	0%	0%
	B3	SIM		20%	0%	30%	0%	0%	50%
	B4	SIM		10%	0%	20%	0%	10%	50%
C	C1	NÃO	SIM	90%	20%	100%	100%	0%	0%
	C2	NÃO		30%	40%	30%	80%	0%	0%
	C3	SIM		0%	0%	60%	100%	40%	50%
	C4	SIM		0%	0%	60%	0%	20%	100%
D	D1	NÃO	NÃO	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	D2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	0%
	D3	SIM		0%	0%	10%	100%	0%	66,7%
	D4	NÃO		0%	0%	0%	0%	30%	50%
E	E1	SIM	SIM	0%	0%	60%	66,7%	0%	0%
F	F1	NÃO	NÃO	0%	0%	40%	50%	30%	50%
	F2	NÃO		0%	0%	30%	50%	80%	100%
G	G1	NÃO	NÃO	0%	100%	20%	100%	0%	0%
	G2	NÃO		20%	83,3%	30%	83,3%	0%	0%
H	H1	NÃO	NÃO	0%	33,3%	0%	66,7%	0%	0%
I	I1	NÃO	NÃO	0%	0%	10%	0%	0%	0%
	I2	NÃO		0%	0%	0%	0%	0%	0%

A-F: Poedeiras comerciais; G-I: Frangos de corte.

Na PCR de diferenciação vacinal, 56,14% (32/87) das amostras de suabe de traqueia e traqueia positivas na PCR Nested para MG foram oriundas da cepa vacinal MG-F. Nos lotes vacinados, 77,8% (28/36) das amostras de suabe de traqueia e 66,7% (12/18) das amostras de traqueia foram positivas para a cepa vacinal. Nos lotes com histórico clínico 60% (15/25) das amostras de suabe de traqueia e de traqueia 43,33% (13/30) foram positiva para cepa vacinal MG-F. Lotes não vacinados apresentaram 26,67% (4/15) e 7,14% (1/14) de amostras positivas para cepa vacinal MG-F de suabe de traqueia e traqueia, respectivamente. Os resultados por lote estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Detecção por meio da PCR da estirpe MG-F de poedeiras comerciais (PC) e frangos de corte (FC) positivas na PCR convencional e PCR Nested.

Granja	Lote	Sinais clínicos	Vacina contra MG	Amostras Positivas MG		% Positivas PCR Vacinal	
				Suabe	Traqueia	Suabe	Traqueia
A	A1	NÃO	SIM	2	0	50%	-
	A2	NÃO		1	0	0%	-
B	B1	NÃO	SIM	2	1	50%	0%
	B2	NÃO		0	3	-	0%
	B3	SIM		3	0	100%	-
	B4	SIM		2	0	100%	-
C	C1	NÃO	SIM	9	5	100%	100%
	C2	NÃO		3	4	33,3%	100%
	C3	SIM		6	1	50%	0%

	C4	SIM		6	2	33,3%	50%
D	D1	NÃO	NÃO	0	0	-	-
	D2	NÃO		0	0	-	-
	D3	SIM		1	3	0%	33,3%
	D4	NÃO		0	0	-	-
E	E1	SIM	SIM	6	2	66,7%	100%
F	F1	NÃO	NÃO	4	1	25%	0%
	F2	NÃO		3	1	66,7%	0%
G	G1	NÃO	NÃO	2	4	0%	0%
	G2	NÃO		4	4	25%	0%
H	H1	NÃO	NÃO	0	1	-	0%
I	I1	NÃO	NÃO	1	0	0%	-
	I2	NÃO		0	0	-	-

A-F: Poedeiras comerciais; G-I: Frangos de corte.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou uma soroprevalência mais elevada de anticorpos para MS do que para MG, corroborando a afirmação feita por Feberwee et al. (2008) e Landman (2014) os quais afirmam que na última década MS vem assumindo o papel de importância em relação a MG em aves comerciais (Buim et al. 2009). Segundo Balen & Fiorentin (1990) esse aumento na prevalência de MS coincidiu com a intensificação do combate a infecção por MG. Isso se deve ao fato de que matrizes positivas para MS não são sacrificadas, perdendo apenas a certificação de livre e se restringindo ao comércio nacional.

Levando em consideração que a vacinação contra MS não é realizada em granjas avícolas de Pernambuco, conclui-se que toda soroconversão é oriunda de cepas de campo. Contudo, os reais efeitos econômicos da infecção por MS ainda são desconhecidos, devido à dificuldade da reprodução da doença e interpretação do diagnóstico, aliada à grande variabilidade na virulência das cepas de MS (Lockaby et al. 1998, Lockaby et al. 1999, Lockaby & Hoerr 1999, Nascimento et al. 2005).

O teste de ELISA foi o teste sorológico que apresentou maior sensibilidade, quando comparado com a SAR e o HI, para detectar anticorpos *anti*-MG e *anti*-MS. Corroborando com o estudo realizado por Ewing et al. (1998), que sugerem a adoção do ELISA, ao invés da SAR, como teste de triagem e a PCR como teste confirmatório.

A ausência ou baixa frequência de resultados positivos para ambos os agentes etiológicos em aves saudáveis pode estar relacionada com a baixa sensibilidade do teste da SAR e alta especificidade do teste de HI no caso de infecções crônicas/subclínicas. A SAR apenas detecta anticorpos do tipo IgM, que são formados poucos dias após a infecção e persistem por apenas 70 a 80 dias, portanto, não há confiabilidade nos resultados negativos à SAR (Nascimento & Pereira, 2009). Em estudos realizados por Nascimento et al. (1994), foi observado que galinhas reprodutoras consideradas negativas na SAR para MG, foram positivas no teste de ELISA, HI e PCR. Em relação ao teste de HI, observa-se uma baixa capacidade de detectar variantes antigênicas que diferem da estirpe utilizada como antígeno hemaglutinante (Kleven, Morrow & Whithear 1988), além de ter baixa sensibilidade para títulos baixos de anticorpos do tipo IgG (Ewing, Kleven & Brown 1996).

Estes fatos constituem motivo de preocupação, pois uma vez não detectado em uma população portadora, esta constituirá como fonte de infecção para as populações não infectadas, dificultando o controle sanitário na granja (dos Santos et al. 2007).

Nota-se que a PCR foi uma técnica rápida e eficaz para o diagnóstico de MG e MS em granjas de poedeiras comerciais e frangos de corte. Observou-se também a capacidade da PCR Nested em detectar DNA de MG em amostras negativas na PCR convencional, sendo essa técnica indicada para casos de negatividade no lote. Outra vantagem da PCR é que as infecções combinadas com outros micoplasmas ou outras bactérias não afetam a reação, tornando-a uma alternativa útil para o diagnóstico da micoplasmose aviária (Nascimento et al. 1991). A PCR também é específica, sensível e capaz de detectar e amplificar DNA em baixa quantidade (Saiki et al. 1985, Innis & Gelfand 1990), auxiliando nos programas de monitoramento avícola e na diferenciação das cepas de campo e vacinal contra MG (Nascimento et al. 1993, Mettifogo et al. 2002).

Houve detecção do DNA de MG com maior frequência do que MS, diferindo dos resultados sorológicos obtidos. Em estudo semelhante realizado no Estado de Pernambuco, Barros et al. (2014) detectaram uma prevalência de 1/24 (4,17%) de amostras positivas para MG e 7/24 (29,17%) para MS na PCR, não corroborando com o presente estudo. Buim et al. (2009) apresentaram resultados diferentes, com apenas 2% de amostras positivas para MG e 32,4% para MS. Tal diferença pode ser explicada devido a quantidade de lotes vacinados, uma vez que boa parte dos lotes, no presente estudo, utilizaram vacina contra MG,

promovendo um maior número de amostras positivas na PCR. Além disso, poucos estudos relacionando o uso da PCR para detecção de MG e MS foram realizados no Estado de Pernambuco, sendo difícil estimar a real prevalência de ambos os agentes nos planteis avícolas do Estado.

Foi observada uma maior percentagem de positividade, tanto para MG quanto para MS, nas amostras de lotes com histórico clínico respiratório e/ou de queda na produção de ovos. Corroborando com estudos semelhantes realizados por Barros et al. (2014), que também detectou uma alta frequência de amostras positivas para MS em poedeiras comerciais com sinais clínicos respiratórios.

A presença de micoplasmas nas propriedades está associada a barreiras sanitárias deficientes, o que é um importante fator de risco para a disseminação da doença (Buim et al. 2009). Este aspecto é importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que os micoplasmas podem ser transmitidos horizontalmente e verticalmente, o que facilita a disseminação dessas bactérias entre lotes de uma mesma granja e entre diferentes granjas, aumentando a frequência dos casos e as perdas econômicas decorrentes da infecção (Buim et al. 2009).

Constatou-se neste estudo a presença de DNA de MG em aves sem estímulo humoral, no qual amostras de cinco lotes de frangos de corte não vacinados, que não apresentaram soro conversão em nenhum dos testes sorológicos, foram positivos na PCR, indicando um estado de latência por parte de MG. E 62,5% (10/16) das amostras positivas nesses lotes foram detectadas de amostras de traqueia e 37,5% (6/16) de suabe de traqueia, sugerindo a presença elevada do agente intracelular na traqueia.

O estado de latência, onde o micoplasma não é reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro, é explicado pela sua localização intracelular, que pode ser de forma espontânea, a exemplo do *Mycoplasma penetrans* ou forçada, a exemplo do MG (Biberstiein & Zee 1990, Razin et al. 1998). Os micoplasmas passam à forma latente e aguardam um estado de debilitação do hospedeiro, seja por infecção por vírus ou outras bactérias, para iniciar um quadro clínico (Whitford et al. 1994, Chin et al. 2003, Kleven 2003a). Os micoplasmas são mais suscetíveis a mutações que outras bactérias (Woese et al. 1985), sendo explicado pela deficiência no sistema de reparo do DNA desses *Mollicutes* (Ghosh et al. 1977). Essas modificações frequentes nos antígenos de superfície facilitam o escape do micoplasma do sistema imune do hospedeiro, facilitando sua sobrevivência quando aderido a mucosa do trato respiratório das aves (Markhan et al. 1998).

A presença de lotes negativos na SAR, HI e ELISA e positivos na PCR é um fato importante para o controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas livres da micoplasmose aviária (Instrução Normativa nº 44), visto que o agente pode eventualmente estar presente em lotes de reprodutoras e passar despercebido por testes de triagem, mantendo uma população de aves positiva. Portanto, percebe-se a importância de se utilizar a PCR independentemente de resultados positivos em testes sorológicos.

Diferentemente de aves reprodutoras que o uso de vacinas contra MG não é permitido, poedeiras comerciais são comumente vacinadas, não sendo possível através da sorologia diferenciar anticorpos de cepas de campo de anticorpos da cepa vacinal utilizada. Portanto, o diagnóstico diferencial para a estirpe MG-F é muito importante no Brasil, visto que esta vacina viva é a mais utilizada pelos avicultores, especialmente em poedeiras comerciais (Mettifogo et al. 2015). A eficiência dessa vacina se dá na resposta de base humoral e celular e como mecanismo de exclusão competitiva das cepas de campo da granja (Nascimento & Pereira 2009).

Contudo, na PCR de diferenciação de cepa de campo e cepa vacinal observa-se nesse estudo a presença de cepas de campo em lotes vacinados e não vacinados, assim como a presença da cepa vacinal MG-F em lotes vacinados e não vacinados, inclusive em lotes de frangos de corte. Tais resultados sugerem a disseminação de cepas vacinais em granjas e lotes não vacinados, inclusive entre granjas de poedeiras comerciais e granjas de frango de corte. A cepa vacinal MG-F é a mais antiga e a mais estudada na substituição de cepas selvagens, mas continua transmitindo-se entre os lotes de galinhas mesmo após a suspensão do uso da vacina. Portanto, é necessário o acompanhamento desses lotes, visto que pode ocorrer reversão da patogenicidade da vacina (Nascimento & Pereira 2009).

CONCLUSÕES

A detecção de anticorpos *anti-Mycoplasma* indica de maneira indireta o potencial agudo e crônico das infecções por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. O teste de ELISA detectou um número maior de aves positivas nos casos de infecções subclínicas, sendo mais indicado como teste de triagem. Destaca-se com esta pesquisa que estudos soroepidemiológicos são importantes em plantéis de poedeiras comerciais e frangos de corte, uma vez que a partir dessas informações, medidas estratégicas poderão ser implementadas para reduzir a ocorrência dessa infecção, tais como medidas de biossegurança mais rígidas, semelhantes às preconizadas para granjas de reprodutoras.

Ressalta-se também a importância do uso de ferramentas moleculares, especialmente da PCR Nested, no diagnóstico das micoplasmoses, visto que foi possível detectar o DNA do agente etiológico em lotes que

não apresentaram soroconversão nos testes sorológicos, ressaltando a importância do uso da PCR independentemente de resultados sorológicos negativos. Destaca-se a relevância de aves frangos de corte positivas para MG, visto que a vacinação contra esta espécie, usualmente, não consta no programa vacinal neste tipo de criação.

Além da PCR convencional, a PCR de diferenciação de cepas de campo e cepa vacinal se mostra fundamental por conta da capacidade de detectar diferentes cepas em um lote de aves, como foi detectada a presença de ambas as cepas em poedeiras comerciais e frangos de corte, fornecendo uma ferramenta a mais para avaliar a saúde dos lotes testados.

REFERÊNCIAS

- Balen L. & Fiorentin L.O. 1990. *Mycoplasma synoviae* e seu impacto econômico sobre a avicultura. Anais Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas/SP. 135-140.
- Barros M.R., Nascimento E.R., Silva J.S.A., Pinheiro Júnior J.W., Santos S.B., Machado L.S., Silva R.C.F. & Mota R.A. 2014. Occurrence of *Mycoplasma synoviae* on commercial poultry farms of Pernambuco, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira. 34(10):953-956.
- Biberstein E.L. & Zee Y.C. 1990. Review of veterinary microbiology. Blackwell Scientific Publications. 213-227.
- Bradbury J.M. 2007. Biosecurity and vaccination control *Mycoplasma* infections. World Poultry. 23:35-36.
- Brasil. 1994. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria Ministerial 193. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF.
- Brasil. 2001. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Sanidade Avícola, Brasília, DF.
- Buim M.R., Mettifogo E., Timenetsky J., Kleven S. & Ferreira A.J.P. 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. Pesquisa Veterinária Brasileira. 29(7):552-556.
- Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L. & Nicholas R.A.J. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Diseases. 54(2):961-964.
- Charlton B.R., Bermudez A.J., Boulianne M., Eckroade R.J., Jeffrey J.S., Newman L.J., Sander J.E. & Wekenell P.S. 1996. Whiteman and bickford's avian disease manual. 4th ed. Pennsylvania. American Association of Avian Pathologists.
- Chin R.P., Yan Ghazikhanian G., Kempf I. 2003. *Mycoplasma meleagridis* Infection. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 8(15): 1539.
- Dos Santos B.M., Marín-Gómez S.Y. & De Paula A.C.B. 2007. Confiabilidade de um teste de triagem para Micoplasmose aviária. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 1(1):18-23.
- Ewing M.L., Cookson K.C., Phillips R.A., Turner K.R. & Kleven S.H. 1998. Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. Avian Diseases. 42(2):230-238.
- Ewing M.L., Kleven S.H. & Brown M.B. 1996. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemagglutination-Inhibition for Detection of Antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in Commercial Broiler, Fair and Exhibition, and Experimentally Infected Birds. Avian Diseases. 40(1):13-22.
- Feberwee A., De Vries T.S. & Landman W.J. 2008. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. Avian Pathology. 37(6):629-633.
- Feberwee A., De Wit J.J. & Landman W.J. 2009. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. Avian Pathology. 38(1):77-85.
- Ghosh A.J. & Maniloff J. 1977. Lack of repair of ultraviolet light damage in *Mycoplasma gallisepticum*. Journal of Molecular Biology. 116(2):337-344.
- Innis M.A. & Gelfand D.H. 1990. Optimization of PCRs. Academic Press, San Diego, California. 3-11.
- Kleven S.H., Morrow C.J. & Whithear K.G. 1988. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* Strains by Hemagglutination-Inhibition and Restriction Endonuclease Analysis. Avian Diseases. 32(4):731-741.
- Kleven, S.H. Mycoplasmosis. 2003. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press, 11 th.719-721.
- Landis J.R. & Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biomet. 33:159-174.
- Landman W.J. 2014. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. Avian Pathology. 43(1):2-8.
- Lauerma L.H. 1998. Manual on: nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Turlock, California. 166.
- Lockaby S.B. & Hoerr F.J. 1999. Virulence of *Mycoplasma synoviae* in poultry: a review. World's Poultry Science Journal. 55(2):175-185.

- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H. & Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*. 35(3):178-90.
- Lockaby S.B., Hoerr F.J., Lauerman L.H., Smith B.F., Samoylov A.M., Toivio-Kinnucan M.A. & Kleven S.H. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*. 43(2):251-261.
- Markham P.F., Glew M.D., Browning G.F., Whithear K.G. & Walker I.D. 1998. Expression of Two Members of the pMGA Gene Family of *Mycoplasma gallisepticum* Oscillates and Is Influenced by pMGA-Specific Antibodies. *Infectology Immunology*. 66(6):2845-2853.
- Mettifogo E., Buim M.R., Ferreira A.J.P., Buzinhani M., Sakata S.T. & Timenetsky J. 2002. Padronização de multiplex PCR para a detecção de *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum* e *M. gallisepticum* cepa F vacinal. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 4:121.
- Mettifogo E., Buzinhani M., Buim M.R., Timenetsky J. & Ferreira A.J.P. 2015. Evaluation of a PCR multiplex for detection and differentiation of *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, and *M. gallisepticum* strain F-vaccine. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(1):13-18.
- Minharro S., Linhares G.F.C., Andrade M.A., Rocha P.T. & Santana A.P. 2001. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos de corte abatidos no Estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*. 2(2):111-117.
- Mohammed H.O., Carpenter T.E. & Yamamoto R. 1987. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Diseases*. 31(3):477-482.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. 2005. Micoplasmoses. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA. 485-495.
- Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Nascimento M.G.F. & Barreto M.L. Avian Mycoplasmosis Update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 7(1):01-09.
- Nascimento E.R., Yamamoto R. & Khan M.I. 1993. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. *Avian Diseases*. 37(1):203-211.
- Nascimento E.R., Yamamoto R., Damassa A.J., Ortmayer H.B. & Nascimento M.G.F. 1994. PCR versus isolamento e sorologia no diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas e perus. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Santos, SP. Brasil. 89-90.
- Nascimento E.R., Yamamoto R., Herrick K.R. & Tait R.C. 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*. 35(1):62-69.
- Ranck M.F., Schmidt V., Philipp H.C., Voss M., Kacza J., Richter A., Fehlhaber K. & Krautwald-Junghanns M.E. 2010. *Mycoplasma synoviae*-associated egg-pole shell defects in laying hens. *Berliner und Münchenertierärztliche Wochenschrift*. 123(3-4):111-118.
- Razin S., Yogev D. & Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4):1094-1156.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. & Arnheim H. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 230(4732):1350-1354.
- Sampaio, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221.
- Stipkovits L. & Kempf I. 1996. Mycoplasmoses in poultry. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 15(4):1495-1525.
- Whitford H.W., Rosenbush R.F. & Lauerman L.H. 1994. *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. Iowa State University Press. 12-14.
- Woese, C. R.; Stackebrandt, E.; Ludwig, W. What are Mycoplasmas: The Relationship of Tempo and Mode in Bacterial Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v. 21, p. 305-316, 1985.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de aves comerciais é uma atividade econômica fundamental para o Estado de Pernambuco, sendo geradora de renda e empregos diretos e indiretos. Contudo, ainda são escassos estudos locais sobre diagnóstico de agentes infecciosos de impacto econômico e social. Nesse estudo foram obtidos resultados relevantes para o entendimento de *Leishmania* spp. e *Mycoplasma* spp. em granjas avícolas, sendo os principais:

- A importância epidemiológica da criação de aves para a Leishmaniose, visto que o ambiente avícola pode atuar como fator de atração para o vetor da enfermidade.
- A necessidade do aprofundamento em técnicas para identificar áreas de risco para Leishmaniose, por que com a PCR de sangue total não se obteve resultados positivos.
- Ressalta-se a importância de se avaliar técnicas de diagnóstico sorológico e sua eficácia, para aprimorar o monitoramento de *Mycoplasma* spp. em plantéis avícolas.
- A relevância da técnica de PCR para detectar *Mycoplasma gallisepticum* em granjas avícolas sem conversão de anticorpos, bem como da PCR Nested de detectar amostras falso negativas na PCR convencional e da PCR vacinal para diferenciar cepas de campo e cepa vacinal em granjas avícolas que utiliza a vacinação contra MG como medida profilática.
- A presença de *Mycoplasma gallisepticum* sem gerar estímulo humoral nas aves demonstra a importância do uso de diferentes técnicas de diagnóstico de forma independente.