

## ***Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal<sup>1</sup>**

Leandro S. Machado<sup>2\*</sup>, Elmiro R. Nascimento<sup>2</sup>, Virgínia L.A. Pereira<sup>2</sup>, David O. Almeida<sup>2</sup>, Rita C.F. Silva<sup>2</sup> e Lídia M.M. Santos<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Machado L.S., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Almeida D.O., Silva R.C.F. & Santos L.M.M. 2012. [***Mycoplasma gallisepticum* as a risk factor on weight of broilers condemned with airsacculitis by Federal Sanitary Inspection.**] *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(7):645-648. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Vital Brazil Filho 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: [leandromachadovet@yahoo.com.br](mailto:leandromachadovet@yahoo.com.br)

The Brazilian poultry industry improves annually and is more representative on production and exportation of their products. Care on poultry health cooperates to these developments, however, respiratory agents that affect weight and carcass quality, continue to threaten poultry production. A airsacculitis is considered the main cause of total and/or partial condemnation of broilers carcasses, being *Mycoplasma gallisepticum* (MG) the most important agent of it. This study aimed to detect MG by "Polymerase Chain Reaction" (PCR) and to correlate its positivity with airsacculitis, weight losses and condemned broilers by Federal Sanitary Inspection. A total of 40 flocks of slaughter broilers under Federal Inspection in Rio Grande do Sul, Brazil, were randomly selected. In each flock three broilers, regardless of sex, were randomly chosen for necropsy where tracheas were collected and pooled in one sample for analysis. For PCR, DNA was extracted by the method of phenol-chloroform and amplified with pairs of specific primers for MG. From the 40 flocks PCR analyzed, 20% (8/40) were positive for MG. MG detection was found to be correlated with airsacculitis increase and weight decrease by multiple logistic regression equation ( $p < 0,05$ ),  $\text{LogitPi} = 7.9409 + (0,5601 \times X1) - (3.3080 \times X2)$ . A airsacculitis rate increase also correlated with decrease in body weight by simple linear regression equation ( $p < 0,05$ ),  $Y = 2.1050 - 0.6397X$ . In conclusion, MG positivity is related to airsacculitis which causes weight loss in broilers. In addition, the PCR was an effective technique for the detection of MG in flocks of broilers, but was not affected by the kind of biological specimens collected, as tracheal scraping or swab.

INDEX TERMS: Broilers, airsacculitis, *Mycoplasma gallisepticum*, PCR.

**RESUMO.**- A Indústria avícola brasileira cresce anualmente e se torna cada vez mais representativa na produção e exportação dos seus produtos. Os cuidados com a sanida-

de avícola têm acompanhado e favorecido essa evolução, entretanto, agentes respiratórios que afetam o peso e a qualidade da carcaça, continuam a provocar grandes prejuízos à produção avícola. A aerossaculite é considerada uma das principais causas da condenação total e/ou parcial de carcaças de frangos de corte, sendo de grande importância *Mycoplasma gallisepticum* (MG). O objetivo do presente estudo foi detectar MG pela PCR e correlacionar sua positividade a aerossaculite, queda de peso e condenação de carcaças de lotes de frangos de corte na Inspeção Sanitária

<sup>1</sup> Recebido em 10 de dezembro de 2011.

Aceito para publicação em 10 de março de 2012.

<sup>2</sup> Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Vital Brazil Filho 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. \*Autor para correspondência: [leandromachadovet@yahoo.com.br](mailto:leandromachadovet@yahoo.com.br)

Federal. Do total de 40 lotes de frangos de corte abatidos sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, foram selecionados ao acaso. Em cada lote, três frangos de corte, independente de sexo, foram randomicamente selecionados para necropsia, sendo as traquéias coletadas e agrupadas em pool para formação de uma amostra para análise. Pela PCR, o DNA foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e amplificado com pares de “primers” específicos para MG. Dos 40 lotes analisados pela PCR, 20% (8/40) foram positivos para MG. Houve relação entre a positividade para MG, aumento da taxa de aerossaculite e queda de peso por Regressão Logística Múltipla ( $p < 0,05$ ),  $\text{LogitPi} = 7,9409 + (0,5601 \times X1) - (3,3080 \times X2)$ . O aumento da taxa de aerossaculite esteve relacionada à queda de peso por Regressão Linear Simples ( $p < 0,05$ ),  $Y = 2,1050 - 0,6397X$ . Em conclusão, a positividade por MG está relacionada à aerossaculite que provoca queda de peso em frangos de corte. Em adição, a PCR foi uma técnica eficaz para a detecção de MG em lotes de frangos de corte, não sendo este diagnóstico influenciado pelo tipo de colheita do material biológico, por escarificado ou *swab* de traquéia.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Frangos de corte, aerossaculite, micoplasmas *gallisepticum*, PCR.

## INTRODUÇÃO

Desde 2004, o Brasil destaca-se como terceiro produtor e maior exportador mundial de carne de frango. Esta posição foi alcançada devido a uma busca constante de evolução na qualidade e manutenção da sanidade avícola, com a presença contínua do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e das Secretarias de Agricultura dos Estados produtores, bem como a participação ativa do setor privado. Em função desse grande desenvolvimento, a preocupação com os aspectos higiênico-sanitários dos produtos avícolas também evoluiu na avicultura brasileira.

A importância de *Mycoplasma gallisepticum* (MG), como agente etiológico de doenças em frangos de corte, desperta a preocupação de técnicos e produtores, assim como de diversas empresas ligadas à cadeia produtiva da avicultura nacional e internacional. No Brasil, existem relatos do aumento das condenações de aves em abatedouros pela presença de aerossaculite, que na sua maioria, pode ser decorrente de infecção pelo MG. (Minharro et al. 2001 & Branco 2004).

Além do aumento das condenações, aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite. A desuniformidade dos lotes na linha de abate aumenta o risco de erros durante a evisceração e, conseqüentemente, maior risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal (Russel 2003).

No Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), as micoplasmoses são consideradas como doenças prioritárias com vistas ao controle e/ou erradicação nos plantéis. As manifestações clínicas de MG são tosse, corrimento, descarga ocular e nasal, decréscimo no consumo de alimentação, retardo de crescimento, lotes desiguais, queda na produção de ovos e mortalidade variável (Nascimento & Pereira 2009). Nas aves reprodutoras adultas, ocorre a

forma crônica ou subclínica com baixo impacto nos índices produtivos. Por outro lado, a progênie costuma ser muito afetada, com descartes em razão de sacos aéreos lesados, ganho de peso reduzido e índices de conversão alimentar negativos (Mettifogo & Ferreira 2006).

O diagnóstico epidemiológico em frangos de corte em idade de abate pode ser realizado por monitoramento sorológico e/ou etiológico, seguindo procedimentos epidemiológicos de amostragem e periodicidade recomendados pelo PNSA (Nascimento & Pereira 2009). Para o monitoramento sorológico, a soroglutinação rápida em placa (SAR), a inibição da hemaglutinação (HI) e o ELISA são os testes recomendados pelos programas sanitários governamentais para os estabelecimentos avícolas, por serem menos onerosos, fáceis de desenvolver e com validade confirmada (Nascimento et al. 2005a, 2006).

Para o levantamento etiológico podem ser realizadas as técnicas tradicionais de isolamento com meio de cultura Frey modificado, provas bioquímicas e de tipificação como: imunofluorescência direta ou indireta de colônias, imunoperoxidase e inibição de crescimento e a PCR (Nascimento & Pereira 2009).

A PCR pode tanto detectar, quanto tipificar o agente, sem a necessidade de um cultivo prévio, e por isso passou a desempenhar um papel de grande importância no diagnóstico laboratorial. Entre as vantagens do diagnóstico molecular, destacam-se a rapidez, a especificidade, a segurança dos resultados, a possibilidade de detecção de agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento, detecção de agentes patogênicos em amostras clínicas de animais assintomáticos ou em tratamento com antibióticos, detecção antes da indução de uma resposta imunológica e em hospedeiros imunocomprometidos, demonstrando vantagens sobre os testes sorológicos (Moreno 2009).

O objetivo do presente estudo foi detectar MG pela PCR e correlacionar sua positividade a aerossaculite, queda de peso e condenação de carcaças de lotes de frangos de corte na Inspeção Sanitária Federal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados aleatoriamente, na área de evisceração, fragmentos de traquéias de três aves de cada lote, de um total de 40 lotes distintos de frangos de corte, em abatedouro avícola sob Inspeção Sanitária Federal, localizado no Estado do Rio Grande do Sul.

Os “pools” de traquéias de cada lote foram acondicionados em placas de Petri esterilizadas. As traquéias foram abertas com uma tesoura de ponta estéril e em seguida seu conteúdo foi coletado com o auxílio de um swab, posteriormente foi realizada a escarificação com lâminas de bisturis estéreis. Os “pools” de swab e de escarificado foram acondicionados separadamente em tubos de rosca contendo 2,0mL de “Phosphated Buffered Saline” (PBS) pH 7,4.

De cada tubo foi retirado uma alíquota de 1,0mL e colocado em tubo graduado de 1,5mL para extração do DNA. O método de extração por fenol/clorofórmio, adaptado de Sambrook et al. (1989), foi realizado diretamente dos “pools” das amostras, sem a realização de pré-enriquecimento. Foi utilizado o par de “primer” específico obtido da porção interna do fragmento de 732 pb de DNA de MG que produzem “amplicons” de 481 pb denominado MG-PCR conforme Nascimento et al. (2005b) e as condi-

ções de amplificação para MG foram feitas de acordo com Buim et al. (2009). Como controle positivo utilizou-se a cepa padrão "American Type Culture Collection" (ATCC) de MG (MGR-ATCC, nº19619). A reação de PCR para MG foi realizada nas seguintes condições: 56µL de água ultrapura (Milli-Q), 10µL de Tampão PCR 10X, 8µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5µL de dNTP mix (0,25mM de cada), 2µL (100pmol) de cada "primer" (5'CGT GGA TAT CTT TAG TTC CAG CTG C3'e 5'GTA GCA AGT TAT AAT TTC CAG GCA T3'), 2µL (2,5U/µL) de Taq Polimerase e 15µL do DNA extraído, obtendo-se um volume final de 100µL.

Após a reação de amplificação, homogeneizou-se 10µL de cada amostracom 2µL de tampão de arrasto, sendo posteriormente analisadas em gel de agarose a 1,5% submerso em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e submetidas as condições de eletroforese de acordo com Sambrook et al. (1989). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,02% e sendo realizada a visualização dos amplicons sob luz ultravioleta em transiluminador.

O peso médio dos lotes de frangos de corte e o percentual de condenação por aerossaculite foi obtido junto à Inspeção Sanitária. Para verificar se a presença de aerossaculite e o baixo peso vivo dos lotes de frangos de corte ao abate era preditivo para MG pela PCR, foi feita a Análise de Regressão Logística Múltipla. A relação da frequência de aerossaculite por lote e o peso vivo foi feita pela Regressão Linear Simples. A comparação entre os lotes positivos e negativos para MG e sua relação com o peso dos lotes foi feita pela análise de t-Student. A influência do tipo de colheita de material biológico (swab, escarificado ou swab+escarificado) sobre o resultado da PCR foi analisada pelo teste exato de Fisher (Thrusfield 2003).

## RESULTADOS

Em todos os lotes estudados observou-se uma taxa de condenação por aerossaculite, variando de 0,0771 a 0,5652%, com média de 0,3212%. Da relação entre positividade na PCR para MG com presença de aerossaculite e peso vivo das aves obteve-se pela Regressão Logística Múltipla a equação  $\text{LogitPi} = 7,9409 + (0,5601 \times X1) - (3,3080 \times X2)$ , significando que MG está associada com aumento de aerossaculite e a queda de peso ( $p < 0,05$ ). A média dos lotes de frangos de corte negativos e positivos para MG foram respectivamente  $2,9130 \pm 0,1690$  e  $2,8251 \pm 0,1077$ , obtendo-se pela equação da Regressão Linear Simples,  $Y = 2,1050 - 0,6397X$ , que o aumento de aerossaculite está relacionado com a queda de peso ( $p < 0,05$ ), onde pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) 16% dos problemas de peso são justificados pela presença de aerossaculite (Quadro 1 e 2).

**Quadro 1. Valores máximo e mínimo e média da frequência de condenações por aerossaculite (%) e do peso médio (kg) dos lotes dos frangos de corte positivos e negativos para Mycoplasma gallisepticum abatidos sob Inspeção Sanitária Federal <sup>a,b</sup>**

|        | Variação da frequência de condenações por aerossaculite (%) |          | Peso médio dos lotes dos frangos de corte (kg) |          |
|--------|---|----------|--|----------|
|        | Positivo  | Negativo | Positivo                                       | Negativo |
| Mínimo | 0,0771  | 0,0176   | 2,64   | 2,58     |
| Máximo | 0,5652  | 0,9435   | 2,96   | 3,26     |
| Média  | 0,3212  | 0,4806   | 2,80   | 2,92     |

<sup>a</sup> Regressão Logística Múltipla ( $p < 0,05$ ):  $\text{LogitPi} = 7,9409 + (0,5601 \times X1) - (3,308 \times X2)$ .

<sup>b</sup> Regressão Linear Simples ( $p < 0,05$ ):  $Y = 2,1050 - 0,6397X$ .

**Quadro 2. Dados descritivos do peso dos lotes de frangos de corte positivos e negativos para MG**

| Parâmetros avaliados | Valores obtidos |          |
|----------------------|-----------------|----------|
|                      | Positivo        | Negativo |
| Número de amostras   | 8               | 32       |
| Média                | 2,8250          | 2,913    |
| Desvio padrão        | 0,1077          | 0,169    |

O diagnóstico pela PCR obtidos em 20% (8/40) dos lotes de frangos de corte analisados, geraram "amplicons" de 481 pares de bases (pb) esperados para MG, de acordo com os "primers" utilizados (Fig.1).

Pelo teste exato de Fisher, comparando-se a detecção de MG em material coletado por swab e escarificação de traquéia, obteve-se um  $p > 0,05$ , não havendo, portanto, diferença significativa entre os tipos de colheita (Quadro 2).

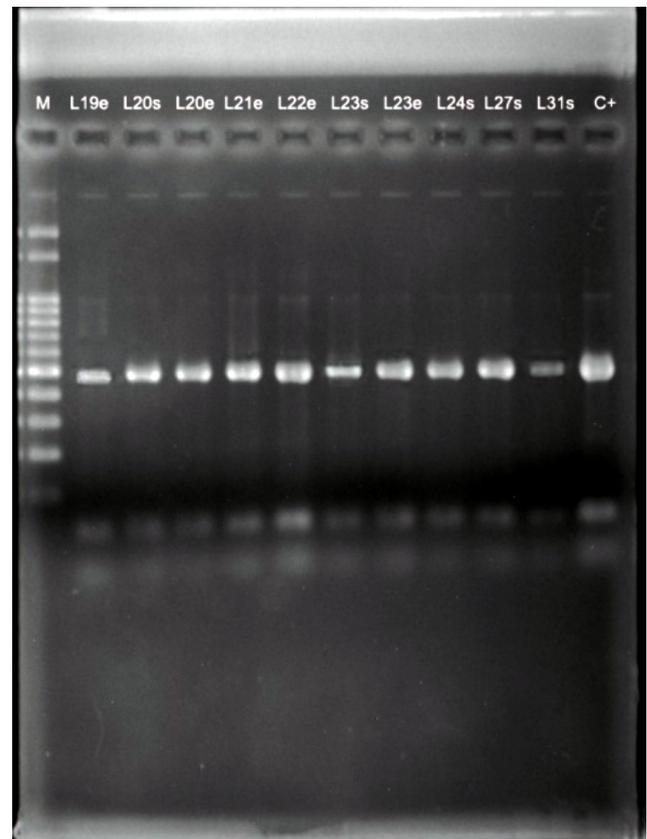


Fig.1. Gel de agarose com os "amplicons" de 481 pb referentes aos lotes L19, L20, L21, L22, L23, L24, L27, L31 positivos para MG pela PCR. M = Marcador de DNA de 100pb, L = lote, e = escarificado, s = swab, C+ = controle positivo.

**Quadro 3. Positivos e negativos para MG por suabe e escarificação como técnicas de colheita do material biológico**

| Técnicas de processamento | PCR MG   |          |       |
|---------------------------|----------|----------|-------|
|                           | Positivo | Negativo | Total |
| Suabe                     | 05       | 35       | 40    |
| Escarificado              | 05       | 35       | 40    |
| Suabe + escarificado      | 02       | 38       | 40    |

Qui-quadrado, IC = 95% ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A taxa média de condenação total e parcial por aerossaculite em lotes de frangos de corte neste estudo ficou acima dos valores notificados pelo SIF para os Estados de Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul entre 2002 e 2003 onde para frangos leves o valor foi de 0,1046% e para pesados 0,1864% (Branco 2004). Em recente trabalho de campo para frangos de corte com sorologia positiva para MG e *Mycoplasma synoviae* (MS) na Turquia, aerossaculite foi o segundo tipo de lesão mais encontrada com frequência de 53,1% (Yilmaz 2011). A presença de aerossaculite, *per se*, é fato que merece ser considerado de grande importância, pois além das perdas determinadas pela condenação de carcaças (Brasil 1998) pode refletir a contaminação nas aves e comprometer a carcaça, com prejuízo para o abatedouro. Aves com aerossaculite podem apresentar-se com menor peso em relação a aves sem aerossaculite e essa desuniformidade na linha de abate aumenta o risco de erros durante a evisceração e, conseqüentemente, maior risco de contaminação das carcaças com patógenos do trato intestinal (Russel 2003).

A escolha da PCR como método diagnóstico neste estudo deveu-se à possibilidade de obtenção eficiente de resultados com rapidez e especificidade, permitindo a tomada de decisões em relação às medidas sanitárias a serem adotadas pela empresa avícola, além do emprego de "primers" mais específicos, resultado da comparação entre MG-PCR/481 com o MG-PCR/732 (Nascimento et al. (2005b). Em outro estudo, Minharro et al. (2001) baseado na colheita de material em "pools" mas somente de frangos de corte condenados por aerossaculite em SIF de Goiás, obteve uma frequência de 32,25%, acima dos 20% encontrados neste trabalho, o que era de se esperar pelos autores terem trabalhado somente com aves de risco. A frequência de MG em 7 lotes de frangos de corte em trabalho de campo nos estados de São Paulo, Pernambuco e Paraná por Buim (2009) foi de 14,28%.

Como não houve significância da influência do tipo de colheita de material biológico no diagnóstico de MG, pode-se supor que tanto swab quanto escarificação podem ser utilizados em se tratando de PCR

## CONCLUSÃO

A positividade de MG por PCR em amostras de traquéia de frangos de corte ao abate teve relação com aumento na condenação por aerossaculite e com o baixo peso dos lotes. No mesmo sentido, o aumento da taxa de aerossaculite está relacionado à queda de peso. A PCR foi uma técnica rápida e sensível para a detecção de MG em lotes de frangos de corte, tomando-se por base os trabalhos prévios, não sendo

este diagnóstico influenciado pela de colheita de material biológico por swab ou escarificação.

**Agradecimentos.**- Ao Programa de Pós-Graduação de Higiene Veterinária e Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense. Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, pela valiosa ajuda deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Branco J.A.D. 2004. Manejo pré-abate e perdas decorrentes do processamento de frangos de corte. Anais Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. Vol.2, FACTA, Campinas. p.129-142.
- Brasil 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-sanitária de Carne de Aves do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº210, de 10 de novembro de 1998. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília/DF, 11 de novembro. 1998. Seção 1.
- Buim M.R., Mettífogo E., Timenetsky J., Kleven S. & Ferreira A.J.P. 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in comercial poultry. Pesq. Vet. Bras.27(7): 552-556.
- Mettífogo E. & Ferreira A.J.P. 2006. Micoplasmose aviária, p.147-151. In: Andreatti Filho R.L. (Ed.), Saúde Aviária e Doenças. Roca, São Paulo. 510p.
- 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 abatidos no Estado de Goiás. Ciênc. Anim. Bras. 2(2):111-117.
- Moreno A.M. 2009. Técnicas moleculares de diagnóstico, p.413-427. In: Revuelto L. & Ferreira A.J.P. (Eds), Patologia Aviária. Editora Manole, Barueri, SP. 510p.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. 2009. Micoplasmoses, p.485-500. In: Di Fabio J. & Rossini L.I. (Eds), Doenças das Aves. FACTA, Campinas.
- Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Nascimento M.G.F. & Barreto M.L. 2005a. Avian mycoplasmosis update. Rev. Bras. Ciênc. Avic. 7(1): 1-9.
- Nascimento E.R., Nascimento M.G.F., Vasconcelos M.P., Barreto M.L., Almeida J.F., Campos C.A.M. & Pereira V.L.A. 2005b. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do amplicon e ajuste no processamento da amostra. Acta Sci. Vet. 33:297-301.
- Nascimento E.R., Polo P.A., Pereira V.L.A., Barreto M.L., Nascimento M.G.F., Zuanaze M.A.F., Corrêa A. & Silva R.C.F. 2006. Serologic response of SPF chickens to live vaccines and other strains of *Mycoplasma gallisepticum*. Rev. Bras. Ciênc. Avic. 8(1):45-50.
- Russel S.M. 2003. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp and *Escherichia coli*. Poult. Sci. 82:1326-1331.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. Vol.2. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Thrusfield M. 2003. Epidemiologia Veterinária. 2<sup>a</sup> ed. Roca, São Paulo. 556p.
- Yilmaz F., Timurkaan N., Kiliç A., Kalender H. & Kiliç Ü. 2011. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. Revue Méd. Vét. 162(2):79-86.