



CAROLINA FONTES PREZOTTO

**COINFECCÃO EXPERIMENTAL COM O
VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS
GALINHAS E *Mycoplasma gallisepticum* EM
PINTINHOS SPF E TRATAMENTO COM
TILOSINA BASE COMERCIAL**

LAVRAS - MG

2013

CAROLINA FONTES PREZOTTO

**COINFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA ANEMIA
INFECCIOSA DAS GALINHAS E *Mycoplasma gallisepticum* EM
PINTINHOS SPF E TRATAMENTO COM TILOSINA BASE
COMERCIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Coorientadores

Dra. Priscilla Rochele Barrios

Dra. Ana Paula Peconick

LAVRAS – MG

2013

CAROLINA FONTES PREZOTTO

**COINFECÇÃO EXPERIMENTAL COM O VÍRUS DA ANEMIA
INFECCIOSA DAS GALINHAS E *Mycoplasma gallisepticum* EM
PINTINHOS SPF E TRATAMENTO COM TILOSINA BASE
COMERCIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013

Dra. Priscilla Rochele Barrios UFLA

Dra. Ana Paula Peconick UFLA

Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Prezotto, Carolina Fontes.

Coinfecção experimental com o vírus da anemia infecciosa das galinhas e *Mycoplasma gallisepticum* em pintinhos SPF e tratamento com tilosina base comercial / Carolina Fontes Prezotto.

– Lavras : UFLA, 2013.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Raimundo Vicente de Sousa.

Bibliografia.

1. CAV. 2. Micoplasmose aviária. 3. Macrolídeo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

*Aos meus pais que me ajudaram diretamente para a realização do meu sonho,
pelo apoio, carinho, amor, paciência, atenção e dedicação.*

*Aos meus irmãos por todo apoio dado, pelo carinho, verdadeiro amor e pela
certeza de que sempre poderei contar com eles em qualquer momento em minha
vida.*

DEDICO
AGRADECIMENTOS

A Deus e à vida pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais Tarcisio e Regina, minha inspiração, força, exemplos de vida, meu orgulho e admiração! Espero um dia ter metade da garra, dedicação, coragem e sucesso que vocês têm.

Aos meus irmãos Leandro e Renata, por toda amizade, companheirismo e amor dados.

Ao orientador, Prof. Raimundo, pelo voto de confiança e grande parceria que tornou este trabalho possível, bem como por todo o apoio e respeito.

À professora coorientadora Priscilla que acompanhou boa parte do meu trajeto na graduação e depois me acompanhou durante meu mestrado. Pela excelente profissional que é e também pela grande amiga que se tornou. Por todos os conselhos dados e conversas em sua sala, agradeço profundamente a Deus por tê-la colocado em minha vida.

À professora coorientadora Ana Paula, pela orientação, grande ajuda e ensinamentos na elaboração deste trabalho. E claro, por ter me ensinado a entender e amar imunologia!

Ao professor Nelson, sempre disposto a me ajudar, pela orientação, respeito, confiança e amizade construída.

À querida Sandrinha que com seus conselhos e ajuda no meu período na UFMG tornou o trabalho possível! Com certeza uma amizade construída para a vida!

Aos meus amigos da UFLA, em especial Lucas, Juliana e Thiago e aos meus amigos de Lavras que foram minha família ao longo do meu mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro dado ao projeto.

À HERTAPE CALIER pelo financiamento da pesquisa. E a Juliana Bastos pela colaboração e quem possibilitou que essa parceria fosse realizada com sucesso!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação (MEC), pela bolsa de mestrado concedida.

Aos profissionais que compõem o Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. A todos aqueles não mencionados, cuja colaboração foi importante para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras que, com muito orgulho, posso afirmar que se tornou o meu lar desde 2006, momento em que larguei a minha cidade natal para desfrutar da honra de fazer parte da grande família UFLA.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras – PRPG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade que me foi dada de fazer um mestrado de excelente qualidade nessa que é uma instituição de grande prestígio nacional.

Por fim, a minha eterna inspiração, os animais!

RESUMO

O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) e o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) são importantes patógenos para galinhas da avicultura industrial, causando, respectivamente, anemia aplástica com imunodepressão e doença crônica respiratória. O CAV está disseminado em galinhas e frangos, além disso, o MG é alvo de erradicação obrigatória dos plantéis de reprodução. Na condição natural, ambas as infecções podem ocorrer simultaneamente. Investigou-se a coinfeção entre CAV e MG em pintinhos SPF (livre de patógenos específicos). Os pintinhos foram divididos em 5 grupos de 4 aves cada. Uma estirpe vacinal foi inoculada via intraperitoneal na dose de $2,3 \log_{10}$ no dia da eclosão (1º dia) e aos 8 dias de vida, esses pintinhos foram desafiados com $6 \times \log_{10}/0,2\text{ml}$ de uma estirpe vacinal cultivada de MG. Em um segundo momento deste estudo, dois dos grupos desafiados com CAV e MG foram tratados com uma tilosina base comercial administrada via água de bebida com o objetivo de analisar a capacidade desta tilosina em reduzir as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo MG. A coinfeção foi obtida com as cepas vacinais ($p < 0,01$) de CAV e MG, observando-se que os escores de lesões no timo, traqueia e sacos aéreos foram sempre superiores nos grupos com coinfeção, indicando sinergismo patogênico entre o CAV e MG vacinal. Além disso, as duas doses de tilosina administradas mostraram-se eficientes na redução das lesões causadas pelo MG na coinfeção desses agentes. Dessa forma foi demonstrada a possibilidade de coinfeção de pintinhos SPF com cepas vacinais de CAV e MG e também demonstrou-se a possibilidade de redução das lesões causadas por MG através do tratamento com tilosina base administrada via água de bebida.

Palavras-chave: CAV. Micoplasmose aviária. Macrolídeo.

ABSTRACT

Chicken Anemia Virus (CAV) and *Mycoplasma gallisepticum* (MG) are important pathogens for chickens, causing, respectively, aplastic anemia with immunosuppression and chronic respiratory disease. CAV is widespread in chickens and broilers, moreover MG is the target for eradication of breeding herds. In natural condition, both infections can occur simultaneously. Was investigated the co-infection between CAV and MG in SPF chicks. The chicks were divided into 5 groups of 4 birds. A vaccine strain was inoculated intraperitoneally in a dose of $2.3 \log_{10}$ in one day old chicks (day 1) and after 8 days, these chicks were challenged with $6 \times \log_{10} / 0.2$ ml of a MG vaccine strain cultivated. In a second moment of this study, two groups challenged with CAV and MG were treated with a commercial tylosin base administered via drinking water in order to examine the ability of this tylosin in reducing gross and microscopic lesions caused by MG. Co-infection was obtained with the vaccine strains ($p < 0.01$) of CAV and MG, noting that the scores of injuries in the thymus, trachea and air sacs were always higher in the groups with the co-infection, indicating pathogenic synergism between these vaccine strains. Also, the two doses of tylosin administered were effective in reducing lesions caused by MG in the co-infection of these agents. It was demonstrated the possibility of co-infection of SPF chicks with CAV and MG vaccine strains and it was demonstrated the possibility of reducing the damage caused by MG by treatment with tylosin base administered via drinking water.

Keywords: CAV. Avian mycoplasmosis. Macrolide.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Figura 1	Escore de lesões macroscópicas de traqueia.	55
Figura 2	Escore de lesões macroscópicas de sacos aéreos.	56
Figura 3	Escore de lesões macroscópicas nos timos.	56

SEGUNDA PARTE – ARTIGO2

Figura 1	Escore de lesões macroscópicas na traqueia.	66
Figura 2	Escore de lesões macroscópicas nos sacos aéreos.....	67
Figura 3	Escore de lesões macroscópicas nos timos.	68

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1 Delineamento experimental	32
--	----

LISTA DE SIGLAS

CAV	Vírus da anemia infecciosa das galinhas
CONAB	Companhia Nacional de Desenvolvimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMS	Síndrome da mortalidade precoce
HI	Inibição da hemaglutinação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDV	Vírus da doença de Marek
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MI	<i>Mycoplasma iowae</i>
MM	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
PPCB	Pleuropneumonia contagiosa dos bovinos
RNA	Ácido ribonucleico
SAR	Soroaglutinação rápida
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SPF	Livre de patógenos específicos (<i>specific pathogen free</i>)
UBABEF	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Avicultura brasileira.....	16
2.2	Anemia Infeciosa das Galinhas.....	18
2.2.1	Etiopatogenia	18
2.2.2	Epidemiologia	20
2.2.3	Sinais clínicos e lesões	21
2.2.4	Diagnóstico e controle.....	22
2.3	Micoplasmoses	22
2.3.1	Etiopatogenia	22
2.3.2	Epidemiologia	25
2.3.3	Sinais clínicos e lesões	25
2.3.4	Diagnóstico e controle.....	26
2.4	Coinfecções na avicultura.....	27
2.5	Uso de antibióticos para tratamento de micoplasmoses	28
2.5.1	Macrolídeos.....	29
3.	OBJETIVOS	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Local de trabalho	32
4.2	Comitê de Ética.....	32
4.3	Animais	32
4.4	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	32
4.5	CAV.....	33
4.6	Delineamento experimental	33
4.7	Escore de lesões.....	34
4.8	Extração de DNA	35
4.9	Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA	36

4.10	Oligonucleotídeos iniciadores	36
4.11	Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR)	37
4.12	Histologia	38
4.13	Estatística	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS (Artigos elaborados conforme a norma da revista <i>Canadian Journal of Veterinary Research</i> – Versão Preliminar).....	50
	ARTIGO 1 COINFEÇÃO EXPERIMENTAL COM ESTIRPES VACINAIS DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS E <i>Mycoplasma gallisepticum</i> EM AVES SPF	51
	ARTIGO 2 AVALIAÇÃO DE DUAS DOSES DE UMA TILOSINA BASE COMERCIAL A SER ADMINISTRADA VIA ÁGUA DE BEBIDA PARA FRANGOS DE CORTE NO TRATAMENTO DE INFEÇÃO POR <i>Mycoplasma gallisepticum</i>.....	61

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a avicultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial. O Brasil encontra-se entre os maiores produtores de carne de frango, sendo o maior exportador. O alto consumo da carne de frango pode ser associado ao preço mais acessível quando comparado a outras proteínas animais, além de não sofrer restrições religiosas e possuir boas características nutricionais que a tornam um atrativo para o consumidor. Apesar de gerar uma importante receita, prejuízos são observados desde a produção até o abate, onde as condenações parciais de carcaça podem chegar a mais de 90% das condenações *post-mortem*. Dentre essas condenações parciais, pode-se destacar a aerossaculite causada por diversos agentes, como micoplasmas.

Os micoplasmas são pequenos procariotos desprovidos de parede celular. Na criação de frangos de corte destacam-se o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *Mycoplasma synoviae* (MS), sendo o MG considerado o mais virulento. O MG é conhecido por causar doença respiratória aguda e crônica com inflamação e produção de exsudato catarral na mucosa do trato respiratório, esse agente tem a habilidade de produzir a doença isoladamente ou se associar com outros agentes que causam doenças respiratórias, como vírus e bactérias. Pela ausência de parede celular, muitos antibióticos não devem ser empregados no tratamento da infecção, como a penicilina.

Dessa forma diversos estudos têm avaliado a eficácia de diferentes classes de antibióticos para combater esse agente. Atualmente na avicultura industrial um dos antibióticos comumente utilizados é a tilosina, pertencente à classe dos macrolídeos, que irá atuar diretamente na inibição da síntese de proteínas do micoplasma.

O vírus da anemia infecciosa da galinha (CAV) foi relatado pela primeira vez em 1979. Desde então já foi encontrado em diversos tipos de criações de aves por todo o mundo, inclusive em aves de subsistência. Por se tratar de uma doença imunodepressora pode atuar como porta de entrada para outros agentes patogênicos. O CAV já foi descrito na literatura em associação com alguns agentes como o vírus da doença de Marek, o vírus da doença infecciosa bursal e o reovírus aviário.

O *Mycoplasma gallisepticum*(MG) possui distribuição mundial e tem grande importância na avicultura por causar doença respiratória aguda e crônica. Sabe-se que o MG possui a capacidade de atuar sinergicamente com alguns agentes, como o da Doença de *Newcastle* e da Bronquite Infecciosa, além de interagir com cepas vacinais dessas mesmas doenças.

Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar os sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas da coinfeção experimental entre o MG e o CAV. E, a partir dessa coinfeção, analisar a capacidade de uma tilosina base comercial administrada via água de bebida, reduzir as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo MG.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Avicultura brasileira

O Brasil destaca-se como grande produtor de proteína animal, sendo o segundo mais importante na produção de carne bovina (atrás apenas dos Estados Unidos), terceiro produtor mundial de carne de frango e quarto maior na produção de carne suína. Em 2011, a exportação de proteína animal gerou uma receita pouco maior que 15,6 bilhões de dólares (REUTERS, 2013).

Ao lado dos Estados Unidos e China, o Brasil encontra-se como um dos maiores produtores de frango do mundo, sendo que desde 2004 detém a posição de maior exportador mundial desse produto. Em 2012, o Brasil produziu mais de 12 milhões de toneladas de carne de frango, dos quais quase quatro milhões de toneladas foram destinadas à exportação, gerando uma receita de aproximadamente 7,07 bilhões de dólares ao país (REUTERS, 2013). No Brasil, a região Sul destaca-se com cerca de 63% da produção nacional de carne de frango, seguido pela região Sudeste e Centro-Oeste (REUTERS, 2013). Os maiores importadores da carne de frango brasileira são Arábia Saudita, União Europeia, Japão, Hong Kong, Emirados Árabes, China, África do Sul, Egito, Kuwait e Iraque (REUTERS, 2013).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango (UBABEF) o aumento no consumo de carne de frango pelo brasileiro passou de cerca de 13kg/habitante em 1989 para quase 39kg/habitante em 2009. Em 2011 o consumo de proteína de frango atingiu pouco mais de 43kg/habitante de acordo com os dados da Companhia Nacional de Desenvolvimento (CONAB), incentivando o aumento da produção desse produto. Segundo dados

de Estudos e projeções do agronegócio (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011), a previsão de aumento do consumo interno da carne de frango que atualmente gira em torno de sete milhões de toneladas por ano, deverá aumentar para quase 11 milhões de toneladas em 2020. Esse aumento no consumo deve-se ao fato da carne de frango ter preços menores se comparados com carnes derivadas de outros animais, além disso, a carne de frango não sofre restrições religiosas quanto ao seu consumo e possui boas características nutricionais que atraem o consumidor (RUTZ et al., 2011).

Dessa forma destaca-se a importância econômica da avicultura no país por ser responsável por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, englobando toda a cadeia produtiva desde empregos oferecidos na produção até processamento e mercado varejista, como também pelas atividades de pesquisa desenvolvidas nessa área (GONÇALVES, 2005).

Porém, sabe-se que de toda a carne de frango produzida anualmente no Brasil, cerca de 30 mil toneladas são perdidas por condenações devido a problemas respiratórios com envolvimento das micoplasmoses, acarretando um prejuízo anual de cerca de 30 milhões de dólares (MACHADO, 2010).

Estudos com outras espécies de micoplasmas mostraram que existem associações com agentes imunodepressores, por exemplo, com o vírus causador da Doença Infecciosa Bursal (GIAMBRONE; EIDSON; KLEVEN, 1977), inclusive sabe-se que o MG tem capacidade de se associar a alguns vírus como o vírus da Doença de *Newcastle* e da Bronquite Infecciosa das aves agravando o quadro respiratório das aves (RODRIGUEZ; KLEVEN, 1980; TIMMS, 1972; WEINACK et al., 1984). O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) é um agente imunodepressor que acomete, dentre outras células, os linfócitos T (ADAIR, 2000; LEY, 2003). Dessa forma, com uma resposta imunológica deprimida, pode ocorrer agravamento das lesões decorrentes da infecção por MG.

Devido aos prejuízos econômicos acarretados pelas micoplasmoses, controle e vigilância são exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001, onde estão previstas medidas de monitoramento das micoplasmoses em estabelecimentos avícolas. Quando se trata de um estabelecimento comercial que cria linhas puras, como bisavós e avós, as galinhas devem ser obrigatoriamente livres de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. Já quando a criação é de matrizes, as fêmeas deverão ser livres de *Mycoplasma gallisepticum* e sob vigilância e acompanhamento para *Mycoplasma synoviae* (BRASIL, 2001).

Diversos estudos demonstram que o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) está amplamente distribuído na avicultura comercial e de subsistência (BARRIOS et al., 2009; FARKAS et al., 1998; MC NULTY et al., 1988; SCHAT, 2003), mesmo assim atualmente se desconhece na legislação brasileira a obrigatoriedade do monitoramento de CAV em produções comerciais que não sejam de aves SPF e galinhas produtoras de ovos controlados para produção de vacinas inativadas, sendo que essas galinhas devem apenas ser livres de manifestações clínicas da doença.

2.2 Anemia Infecciosa das Galinhas

A seguir, será descrita a etiopatogenia do agente causador da Anemia Infecciosa das Galinhas.

2.2.1 Etiopatogenia

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) teve sua primeira descrição em 1979 no Japão em aves livres de patógenos específicos (SPF)

citado por Mohamed (2010). O agente foi classificado como pertencente à família *Circoviridae* e sendo único agente pertencente ao gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999), é atualmente um dos menores vírus de aves conhecidos, variando de 23-25nm, não envelopado, possui forma icosaédrica e seu genoma é um DNA circular de fita simples negativa com cerca de 2kb (GELDERBLUM et al., 1989; MC NULTY et al., 1989; NOTEBORN et al., 1991).

Seu genoma com três janelas abertas de leituras (ORF) codificam três proteínas virais (VP1, VP2 e VP3). Dentre elas a VP1 é a maior proteína presente no capsídeo, sendo que as partículas virais criadas por essa proteína podem ser encontradas em estágios tardios do ciclo do vírus em diversos órgãos como timo, baço e fígado (YUASA et al., 1983). A VP2 é uma proteína não estrutural, normalmente encontrada nas células na fase de replicação do agente. Ambas as proteínas são reconhecidas por possuírem a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes (KOCH et al., 1995; NOTEBORN; KOCH, 1995). Já a proteína VP3 (uma proteína não estrutural) é também conhecida como apoptina, e após a transformação viral de células linfoblastoides, ela pode ser encontrada em associação tanto com a cromatina nuclear das células como com estruturas apoptóticas. A VP3 sozinha é capaz de induzir apoptose de células T linfoblastoides (NOTEBORN; VAN OORSCHOT; VAN DER EB, 1998).

Por se tratar de um vírus não envelopado, o agente é altamente resistente ao ambiente, a inativações químicas e por calor (BRENTANO, 2009). Possui resistência à fumigação com formol por 24 horas, ao tratamento ácido (pH 3,0) por 3 horas e aos desinfetantes à base de glutaraldeído 1%. Em criações de aves SPF, o uso no ambiente de desinfetantes pH 2,0 mostra-se eficiente para inativar o vírus (BRENTANO, 2009).

Logo após a infecção com o vírus, os hemocitoblastos na medula óssea são uma das primeiras células alvo do agente, sendo que sua destruição causa

uma grave depleção de células eritroides e mieloides, levando à anemia e hemorragia (ADAIR, 2000). Os precursores de células T no timo também são alvos do agente e sua capacidade de infectar linfócitos TCD4+ faz com que ocorra uma redução tanto na resposta imune celular quanto na resposta imune humoral da ave, influenciando diretamente na defesa da ave contra outros patógenos (ADAIR, 2000; BRENTANO, 2009). Porém, estudos demonstram que as células TCD8+ são mais susceptíveis ao vírus do que as células TCD4+, fazendo com que ocorra uma maior dificuldade na eliminação de patógenos intracelulares, o que irá permitir uma maior ocorrência de infecções crônicas (Adair et al., 1993; BRENTANO, 2009).

Macrófagos também são afetados através de alterações na expressão de seus receptores Fc, fagocitose e outras atividades microbicidas dessas células. A influência do vírus nos macrófagos pode tanto ser diretamente através da ligação de partículas virais aos mesmos quanto por mediação de fatores secundários (ADAIR, 2000).

2.2.2 Epidemiologia

Desde sua descrição, o CAV pode ser detectado em criações comerciais e de subsistência em várias partes do mundo, causando a doença denominada anemia das galinhas (BARRIOS et al., 2009; SCHAT, 2003). Apesar de ser uma doença específica de galinhas, anticorpos para a infecção já foram detectados em codornas e não há relatos em outras espécies de aves domésticas ou selvagens (FARKAS et al., 1998; MC NULTY et al., 1988). A transmissão do vírus pode ser tanto horizontal quanto vertical. A rota fecal-oral apresenta-se como principal forma de infecção horizontal, porém o vírus já foi detectado no eixo de penas, sugerindo outras formas de transmissão horizontal (DAVIDSON et al.,

2008; YUASA et al., 1983). A transmissão vertical também é possível quando o macho ou a fêmea estão infectados (CARDONA; OSWALD; SCHAT, 2000; HOOP, 1992).

2.2.3 Sinais clínicos e lesões

Em aves jovens de duas a cinco semanas de idade pode ser observada a doença clínica. Aumento na mortalidade, redução no ganho de peso, anemia, atrofia generalizada de órgãos linfoides e hemorragias no tecido subcutâneo e intramuscular são encontrados nas aves (DHAMA et al., 2002; MC NULTY, 1991; NATESAN et al., 2006; TODD, 2000). Em aves adultas pode-se encontrar a doença em sua forma subclínica. Por se tratar de uma doença imunodepressora, uma vez que afeta hemocitoblastos na medula óssea e precursores de células T no timo, predispõe a ocorrência de doenças secundárias concomitantemente além de falhas vacinais (ADAIR, 2000).

Em aves necropsiadas normalmente observa-se palidez na musculatura, hemorragias ocasionais, redução no tamanho do timo além de outros órgãos linfoides, a medula óssea pode estar amarelada devido à presença de tecido gorduroso e proliferação do estroma celular substituindo as células hematopoiéticas mortas (KUSCU; GÜREL, 2008). Já nas lesões microscópicas pode ser observada no timo depleção focal no córtex, corpos apoptóticos, inclusões intranucleares e observa-se também a re-população do córtex. No fígado encontra-se inchaço de hepatócitos, degeneração vacuolar e focos linfoides (HARIDY et al., 2012; KUSCU; GÜREL, 2008; SMYTH et al., 1993).

2.2.4 Diagnóstico e controle

O diagnóstico de CAV pode ser realizado através de isolamento viral, detecção de anticorpos ou por detecção do genoma do vírus através de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SIMIONATTO et al., 2005).

O controle da doença é realizado através do monitoramento sorológico de matrizes. Através de testes como ensaio imunoenzimático (ELISA) do plantel, estratégias de imunização de lotes podem ser implantadas. Atualmente há vacinas atenuadas disponíveis no mercado, porém sabe-se que apesar de atenuadas elas não são totalmente apatogênicas, o que pode limitar o uso em aves muito jovens e atuar como fator predisponente de outras infecções. Objetivando evitar a imunodepressão em aves jovens o uso da vacinação deve ser no máximo até quatro semanas antes do início da postura a fim de se evitar a transmissão do vírus vacinal para a progênie (BRENTANO, 2009).

2.3 Micoplasmoses

A seguir, será descrita a etiopatogenia do *Mycoplasma gallisepticum*.

2.3.1 Etiopatogenia

Os micoplasmas são bactérias pertencentes à classe Mollicutes, a ordem Mycoplasmatales, a família *Mycoplasmataceae* e ao gênero *Mycoplasma*. O primeiro micoplasma cultivado em 1898 foi agente da pleuropneumonia contagiosa dos bovinos (PPCB), sendo que na avicultura a infecção foi descrita

pela primeira vez na Inglaterra, em perus, por Dodd em 1905. Porém, apenas em 1952, quando descoberta a associação entre o agente causador da Doença Crônica Respiratória e da Sinusite Infeciosa dos Perus, que tal patógeno foi denominado *Mycoplasma gallisepticum* (LEY, 2008; SANTOS et al., 2009; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Esses procariotos são caracterizados por possuírem uma sequência de genes RNA ribossômicos 16S, pequeno genoma (580-1350kb), com baixa quantidade de citosina (C) e guanina (G) e requerem colesterol para seu crescimento (LEY, 2003; KLEVEN, 2008).

Os MG são *gram* negativos, com formato cocoide, se coram por Giemsa e não possuem parede celular, além de ter um crescimento muito característico de suas colônias em forma de ovo frito. Micoplasmas em geral precisam de um meio rico em proteínas, por isso, soro é adicionado uma vez que provê ao meio, lipídios (colesterol) e proteínas (RAMIREZ et al., 2008) para crescimento do agente. Além disso, penicilina e acetato de tálio são acrescidos com a finalidade de evitar contaminantes (HANNAN, 2000; KHIARI et al., 2011; KLEVEN, 2008).

Hoje, são conhecidos mais de 20 espécies de micoplasmas que infectam frangos ou perus, sendo descrito principalmente o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *Mycoplasma synoviae* (MS) que causam doença em frangos e perus, o *Mycoplasma meleagridis* (MM) que causa importante doença respiratória em perus e o *Mycoplasma iowae* (MI) isolado primariamente em perus (BUIM et al., 2009; KLEVEN, 1998; KLEVEN, 2008; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Porém, quando discutido doenças respiratórias, epidemiologicamente os micoplasmas mais importantes são os *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, sendo que o MS causa sinovite e aerossaculite e o MG causa doença respiratória aguda e crônica, com inflamação e produção de exsudato catarral na mucosa do trato respiratório (SPRYGIN, 2010). Dessas duas espécies, o MG é considerado o mais virulento (GONÇALVES, 2005; LEY, 2008).

Seus sítios de ligação são membranas mucosas e serosas do trato respiratório e genital, iniciando sua infecção com colonização do trato respiratório, seguido de traqueíte e aerossaculite (VOGL et al., 2008). O MG pode evoluir para uma infecção sistêmica, causando salpingite, artrite e passagem do microrganismo do hospedeiro para o ovo (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000). A aerossaculite é considerada uma das mais importantes lesões responsáveis por condenação total e parcial de carcaça na linha de inspeção do frigorífico pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (GONÇALVES, 2005; LEY, 2003).

Os mecanismos da patogenia dos micoplasmas envolvem desde a competição com as células dos hospedeiros por substratos metabólicos como lipídios, a adesão às células do hospedeiro (GOH et al., 1998; LEY, 2008; PAPAIZISI et al., 2000, 2002). Em 1989, houve o primeiro relato de um micoplasma (*M. fermentans*) com capacidade de invadir células do hospedeiro, sendo que o MG mostrou-se hábil invasor de células HeLa e fibroblastos de embrião de frango, além de conseguir invadir eritrócitos de aves, o que possibilita uma melhor distribuição sistêmica, uma vez que dessa maneira o patógeno tem a vantagem de escape do sistema imune, redução na eficácia do antibiótico durante tratamento além de benefícios nutricionais (VOGL et al., 2008).

Uma importante característica dos micoplasmas é sua capacidade de persistência, devido à sua localização intracelular. Isso ocorre de forma forçada no MG devido à pressão ambiental, especialmente causada por antimicrobianos (SANTOS et al., 2009). Além disso, micoplasmas têm grande capacidade mutagênica por deficiência no sistema de reparo do DNA (GHOSH; DAS; MANILOFF, 1977), sendo comum uma grande diversidade fenotípica do MG devido aos fenômenos como variação antigênica e *switch* fenotípico, permitindo um escape do sistema imune, estratégias diversificadas para invasão em

diferentes tecidos do hospedeiro e cronicidade da doença (NOORMOHAMMADI, 2007).

2.3.2 Epidemiologia

As micoplasmoses têm distribuição mundial e todas as idades são susceptíveis. Seu período de incubação é de 6 a 21 dias, sendo que situações de estresse, alterações de temperatura ambiental, transporte e superlotação de galpões favorecem a infecção por micoplasmas (GONÇALVES, 2005). Apesar da ausência de parede celular, os micoplasmas mantêm-se viáveis no ambiente por vários dias desde que protegidos do sol (MACHADO, 2010; NAGATOMO et al., 2001).

A transmissão pode ocorrer tanto de maneira horizontal como vertical, sendo que aerossóis, acasalamento ou inseminação artificial, contágio direto com outras aves e indireto por meio de pessoas, animais, ração e água são os principais meios de transmissão horizontal. Já a transmissão vertical se dá principalmente quando o ovócito toca os sacos aéreos infectados ou quando o ovo é depositado em um ambiente contaminado (OLANREWAJU et al., 2009; SANTOS et al., 2009). A transmissão horizontal ocorre de maneira muito rápida no galpão e isso permite a contaminação do lote em poucas semanas, já a transmissão vertical é o principal motivo que dificulta o controle e a erradicação da doença (LEY, 2008; MACHADO, 2010; NAGATOMO et al., 2001).

2.3.3 Sinais clínicos e lesões

Os sinais clínicos causados pela infecção por MG são tosse, secreção ocular e nasal, diminuição na ingestão de alimento, retardo de crescimento com animais de tamanhos diferentes no mesmo lote, além de queda na produção de ovos e mortalidade variável. Na necropsia, depósitos de fibrina nos sacos aéreos podem ser observados, assim como peri-hepatite fibrinosa e pericardite com aderência – lesões que levam a condenação da carcaça, especialmente quando ocorrem infecções secundárias (LEY, 2003; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). É importante considerar que fatores como baixa temperatura, alta concentração de amônia, estresse e associação com vírus imunodepressores podem influenciar na severidade das lesões causadas por essa infecção (LEY, 2008; MACHADO, 2010).

Alterações microscópicas na traqueia como perda de cílios, variação na espessura da mucosa, infiltrações de células mononucleares, hiperplasia das glândulas mucosas e reações linfoliculares podem ser encontradas. O pulmão também pode ser afetado, encontrando-se áreas de pneumonia intersticial, granulomas em algumas ocasiões e alterações linfoliculares (CHIN; GHAZIKHANIAN; KEMPF, 2003; LEY, 2003; YODER JÚNIOR, 1991). A redução na eficiência alimentar, crescimento reduzido da ave, diminuição na postura de ovos, aumento de mortalidade, redução da uniformidade do lote, além de depreciação do produto no processamento de carnes são apenas algumas das perdas econômicas geradas pelos micoplasmas (LEY, 2003; MINHARRO et al., 2001; PAKPINYO; SASIPREEYAJAN, 2007; SANTOS et al., 2009).

2.3.4 Diagnóstico e controle

No diagnóstico, a soroglutinação rápida (SAR) é utilizada como procedimento sorológico inicial em criações de aves, uma vez que possui grande

sensibilidade, é rápido, de baixo custo e fácil realização (SANTOS; MARIN; BARBOSA, 2007), porém devido à ocorrência de falsos positivos, caracterizando baixa especificidade, outros testes podem ser utilizados no laboratório como o ELISA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e inibição da hemaglutinação (HI) (BRASIL, 2001; MAY; BRANTON, 1997; RAVIV et al., 2008; RHOADES, 1978; SLAVIK; WANG; CAO, 1993; TAKASE et al., 2000).

2.4 Coinfecções na avicultura

Coinfecções ocorrem comumente em diversas produções animais e na avicultura não é diferente. No âmbito de doenças do trato respiratório, alguns dos agentes mais importantes causadores dessas doenças são conhecidos não só por terem a capacidade de causar a doença por si só, mas por interagirem uns com os outros, ou então com outros agentes virais e bacterianos. Dentre esses agentes podem ser citados o pneumovírus aviários, o vírus da influenza aviária, o vírus da bronquite infecciosa, o vírus da doença de *Newcastle* e o *Mycoplasma gallisepticum* (YASHPAL; DEVI; SAGAR, 2004).

As interações de micoplasmas com outros agentes têm sido estudadas, sendo que o MG interage sinergicamente com os agentes da Doença de *Newcastle* e da Bronquite Infecciosa e, inclusive, interage com as cepas vacinais dessas mesmas doenças (KLEVEN, 1998). O MG também interage com outros patógenos como os vírus causadores de Doença Infecciosa da Bolsa Cloacal, da laringotraqueíte, o adenovírus, o reovírus e o *Avibacterium paragallinarum* e a *E. Coli* (KLEVEN, 1998; MACHADO, 2010). Descrições de infecções experimentais assim como levantamento sorológico em plantéis comerciais mostram que diferentes agentes podem atuar de maneira sinérgica na produção

de lesões (LEIGH et al., 2012; NAYLOR et al., 1992; ROUSSAN; HADDAD; KHAWALDEH, 2008; TORO et al., 2005; TORO et al., 2009).

Além dos micoplasmas, o CAV também tem a capacidade de interagir com outros agentes como o vírus da doença de Marek (MDV), o reovírus e o vírus da doença infecciosa bursal (ou doença de Gumboro) (HARIDY et al., 2009; MC NEILY et al., 1995; TORO et al., 2009). O CAV já foi detectado em diversos surtos da doença de Marek em diferentes países como Japão, Estados Unidos, Itália, Alemanha, Israel (DAVIDSON et al., 2004; DE BOER et al., 1989; FEHLER; WINTER, 2001; OTAKI et al., 1987; ZANELLA et al., 2001). A coinfeção de CAV com o vírus da Doença de Marek em aves com menos de duas semanas de idade causa a síndrome da mortalidade precoce (EMS) (GORYO; OKADA, 1994; ZANELLA et al., 2001). Além de CAV e MDV, outro experimento demonstrou que o CAV e o reovírus aviário também possuem a capacidade de atuar de maneira sinérgica quando administrados concomitantemente em aves SPF de um dia de idade, levando a uma redução no ganho de peso e um dano mais grave observado nos tecidos (MC NEILLY et al., 1995). Outros estudos demonstraram a habilidade do CAV e do vírus da doença infecciosa bursal afetarem o desenvolvimento das aves através de lesões, imunodepressão e anemia (GALLARDO; VAN SANTEN; TORO, 2012; TORO et al., 2009).

2.5 Uso de antibióticos para tratamento de micoplasmoses

A ausência de parede celular nos micoplasmas limita a adoção de antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas, no tratamento de aves doentes, uma vez que esses atuam apenas na parede celular de bactérias (KLEVEN, 1998; SANTOS et al., 2009). Outros antibióticos como tiamulin, quinolonas (como enrofloxacin), tetraciclina e macrolídeos (como tilosina) são preconizados no

tratamento das micoplasmoses (MACHADO, 2010). Porém, quando se aborda a utilização de tiamulin e enrofloxacin, o diagnóstico de micoplasmose pode ser afetado uma vez que esses fármacos se acumulam em altas concentrações nas membranas mucosas do trato respiratório, reduzindo até impedindo a atuação de resposta imune, dificultando o isolamento e detecção de anticorpos em frangos de corte, assim como em poedeiras e em aves de reprodução (KEMPF, 1991; NASCIMENTO et al., 1999). Apesar de se saber que esse quadro pode ser revertido com a suspensão do uso desses antibióticos, é importante adotar um antibiótico que seja eficaz no tratamento de micoplasma e que não afete ou inviabilize o diagnóstico da doença no plantel. Dessa forma, os macrolídeos ainda são os antimicrobianos mais indicados no tratamento de doença crônica respiratória e da sinovite infecciosa causados por MG e MS respectivamente.

2.5.1 Macrolídeos

Os macrolídeos são compostos por um anel de macrolactona glicosidicamente ligado a um açúcar ou mais, sendo que os diferentes tipos de macrolídeos irão atuar da mesma forma, inibindo a síntese de proteínas através de sua ligação ao 23S rRNA, que é componente da subunidade ribossômica 50S dos microrganismos susceptíveis (GERCHMAN et al., 2011), pois bloqueiam a translocação do RNAt peptídico do sítio acceptor para o sítio doador. Conforme o patógeno e a concentração do antibiótico podem tanto atuar como bacteriostáticos ou como bactericidas dependendo de sua concentração plasmática (TENÓRIO, 2007; SPINOSA, 2011). Em alguns países, como os Estados Unidos, alguns macrolídeos (como a tilosina) também são utilizados como promotores de crescimento em suínos e aves (MC EWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

No grupo dos macrolídeos, há três importantes antibióticos usados, sendo eles a tilmicosina, a eritromicina e a tilosina, sendo esta última a mais conhecida na avicultura (LEWICKI, 2006), muito utilizada como tratamento e prevenção de doença respiratória em galinhas, frangos ou em perus (KLEVEN, 2008).

A tilosina, considerada entre todos os macrolídeos o mais ativo, principalmente para micro-organismos aeróbicos, *gram*-negativos, cocos, bacilos e micoplasmas (LEWICKI, 2006) pode se apresentar como ácido tartárico que é hidrossolúvel, sal de fosfato adicionado no alimento (LÓPEZ; OLVERA, 2010) e tilosina base. A má absorção do fosfato faz com que haja menor disponibilidade sérica dessa forma de apresentação da tilosina, sendo recomendado para isso o aumento da dose a ser utilizada. Já sob a forma de sal de tartarato, indica-se o uso principalmente na água potável, porém, mesmo dessa maneira continua tendo uma atuação inferior a outros antibióticos como a tiamulina (LEWICKI, 2006). A tilosina base normalmente é administrada via injetável, o que dificulta seu emprego na rotina na avicultura e até o momento não há estudos sobre administração de tilosina base por via oral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigou-se a coinfeção de CAV e *Mycoplasma gallisepticum* em pintinhos livres de patógenos específicos (SPF) e, a partir dessa coinfeção, investigou-se a capacidade duas diferentes doses de uma tilosina base comercial administrada via água de bebida, em reduzir as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo MG.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisou-se os sinais clínicos da coinfeção experimental.
- Foi feito o tratamento dos grupos infectados com uma tilosina base comercial administrada via água de bebida nas doses de 60 mg/kg a cada 24 horas (D1) e 400 mg/L a cada 24 horas (D2).
- Foi realizado o escore de lesões macroscópicas de timo, traqueia e sacos aéreos.
- Coletou-se timo para pesquisa de material genético de CAV.
- Coletou-se traqueia e sacos aéreos para pesquisa de material genético de MG.
- Coletou-se timo, traqueia, fígado e baço para análise histológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de trabalho

O experimento foi conduzido no Setor de Doença das Aves na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2 Comitê de Ética

O projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética (CEUA) com o número de registro 074/2011.

4.3 Animais

Foram utilizados 25 pintinhos (*Gallus gallus domesticus*) livres de patógenos específicos (SPF), distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos de cinco aves. Ovos SPF certificados obtidos da Valobiomedia® foram alojados em uma incubadora modelo PS *premium* ecológica Ltda. até o nascimento dos pintinhos. Com um dia de vida, os pintinhos foram realocados para um isolamento onde permaneceram até a coleta das amostras. Essas aves receberam água e ração *ad libitum* livre de promotores de crescimento e coccidiostáticos.

4.4 *Mycoplasma gallisepticum*

Uma vacina viva atenuada com a cepa MgF (Biovet, São Paulo) foi reconstituída e cultivada em meio de Frey (FREY; HANSON; ANDERSON, 1968) até a obtenção de uma densidade de 3×10^{13} UFC/0,1 ml.

4.5 CAV

Uma vacina viva atenuada com a cepa *Cuxhaven* (Cux-1) (*Lohmann Animal Health*, Alemanha) foi reconstituída até obter-se $10^{2,3}$ doses infectantes por mL para 50% dos cultivos celulares (DICC50%).

4.6 Delineamento experimental

Pintos de ovos SPF certificados com um dia de vida foram divididos em cinco grupos de cinco aves cada. Com um dia de vida, essas aves foram inoculadas, sendo que o grupo 1 e o grupo 2 receberam 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato por via intraperitoneal e os outros grupos nesse mesmo dia, foram inoculados com 0,2 mL da amostra vacinal de *Cuxhaven* (Cux-1) (*Lohmann Animal Health*, Alemanha) com $10^{2,3}$ doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares (DICC50%) por via intraperitoneal. Após decorridos oito dias dessa primeira inoculação, foi inoculado 0,2 mL da amostra cultivada vacinal de MgF (Biovet, São Paulo), sendo que o grupo controle negativo (1) foi inoculado com apenas o caldo de meio de Frey, sem presença de micoplasmas. A dose de 0,2mL foi repartida com 0,1 ml aplicado intraperitonealmente e 0,1 ml via intranasal.

Dessa forma, os tratamentos ficaram estipulados de acordo com o quadro abaixo:

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
GRUPOS	DESCRIÇÃO
1	Controle negativo (solução salina, sem inoculação de CAV e MG)
2	Controle positivo para MG (sem inoculação de CAV, inoculado com MG)
3	Controle positivo para MG e CAV (inoculado com CAV e MG)
4	Infectados com MG e CAV tratados com tilosina base na dose de 60 mg/kg a cada 24 horas via água de bebida (inoculado com CAV e MG) (D1)
5	Infectados com MG e CAV tratados com tilosina base na dose de 400mg/L a cada 24 horas via água bebida (inoculado com CAV e MG) (D2)

Os tratamentos com a tilosina base (D1 e D2) foram iniciados 10 dias após a inoculação com MG vacinal, realizados por cinco dias consecutivos. Um dia após o término dos tratamentos, foi realizado o abate sanitário de todas as aves, onde foi coletado material para PCR (timo, traqueia e sacos aéreos) e também material para histopatologia (timo, traqueia, fígado e baço).

4.7 Escore de lesões

Na necropsia foi realizada uma análise das lesões macroscópicas, sendo elas classificadas de acordo com tabela de escore de lesões descritas por Kogut et al. (1994) modificado, mostradas a seguir:

- Escore de lesão da traqueia: 1- sem alterações; 2 – presença de muco; 3 – muco e áreas hiperêmicas; 4 – exsudato catarral e

hemorragias; 5 – obstrução parcial e/ou completa da traqueia e morte.

- Escore de lesão dos sacos aéreos: 1 – sem alterações; 2 – alteração de espessura; 3 – alteração de espessura e opacidade; 4 – presença de bolhas e acúmulo de exsudato; 5 – deposição de fibrina.
- Escore de lesão do timo: 1 – sem alterações; 2 – pouca redução de tamanho; 3 – clara redução de tamanho; 4 – ausência de alguns lobos nos dois lados do pescoço; 5 – completa atrofia.

4.8 Extração de DNA

A extração do DNA dos tecidos (traqueia e timo) foi feita pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom et al. (1990) modificado. A extração foi realizada por meio da reação do material bruto previamente macerado (200 µL), com aproximadamente 600 µL de iodeto de sódio (NaI) a 6M, sob aquecimento a 55° C e forte homogeneização em vórtex a cada cinco minutos, durante 15min. O material obtido foi submetido à centrifugação por três minutos a 3000 g e a parte líquida foi coletada com o auxílio de uma pipeta e colocada em um novo tubo. Junto com 50 µL de suspensão de sílica, a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex. A mistura foi incubada em agitador por dez minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 12000g, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O sedimento foi ressuscitado em 800 µL de NaI e homogeneizado com o auxílio de vórtex. A mistura foi novamente centrifugada por 30 segundos a 12000 g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento (DNA ligado à sílica) foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (Etanol 60%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após

centrifugação por 30 segundos a 12000g, todo o tampão de lavagem foi descartado.

Foi adicionado 1 mL de acetona e após homogeneização no vórtex e centrifugação por 30 segundos a 12000g, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta, mantido a 55°C por 10 minutos. O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50 µL de TE 0,5X (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), levemente homogeneizado e incubado a 55°C por 10 minutos, sendo que, a seguir, o tubo foi centrifugado por dois minutos a 12000g, para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, tendo-se o cuidado de não misturar a sílica novamente, que determinará a necessidade de novas centrifugações a 12000g, para eliminar totalmente a sílica da amostra. Após centrifugação e coleta do DNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

4.9 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *NanoVue®* (GE, *Healthcare*, Reino Unido) a 260nm, 280nm e sua razão.

4.10 Oligonucleotídeos iniciadores

Na PCR para CAV foram usados os iniciadores descritos por Marín et al. (2012) CAVMGF 5'CCTGTTCCGACACATTGA3' correspondendo aos nucleotídeos 1444 a 1461 e o CAVMGR 5'TATGGCCTCTGCCTGTTA3' que

corresponde aos nucleotídeos 2119 a 2136. A posição dada aos nucleotídeos no genoma completo do CAV foi de acordo com a sequência da estirpe Cuxhaven-1 (M55918.1 *GenBank*). Já na PCR para MG foram utilizados os iniciadores recomendados pela OIE MG-14F 5' GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3' e MG-13R 5'GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC3'.O tamanho dos fragmentos amplificados foram de 185 pares de base para MG e 693 pares de base para CAV.

4.11 Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

De acordo com protocolo de Marín et al. (2012) para PCR de CAV uma alíquota de cada amostra de DNA total obtida da extração dos timos. Foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: 200ng de DNA, tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 0,4mM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 1 µL de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de *Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase – Invitrogen)* e água ultrapura 18,2 deionizada. A PCR foi feita no termociclador (modelo PTC 100, MJ *Research, Watertown, MA*) nas seguintes condições, um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., por anelamento a 52°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 min., além de uma extensão final a 72°C por 10 min.

De acordo com protocolo da OIE para PCR de MG uma alíquota de 5 µL de cada amostra de DNA total obtida da extração das traqueias foi utilizada na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: tampão 10X(200mM tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 1 µL de dNTP, 2 µL de MgCl₂, 0,5 µL de cada iniciador a 20 pmol/ µL, 0,25 UI de *Taq Polimerase* e 35,75 µL de água deionizada. A PCR foi feita no termociclador (modelo *Nyxtechnik®*) nas

seguintes condições, um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., por anelamento a 55°C por 1 min. e extensão a 72°C por 2 min., além de uma extensão final a 72°C por 5min.

4.12 Histologia

Transcorridas 48 horas da coleta do material, as amostras foram clivadas e colocadas em cassetes identificados com o nome do órgão correspondente e colocados no aparelho histotécnico para o processamento e fixação. Durante o processamento, as amostras foram submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), posteriormente também submersas em xilóis e finalmente em dois banhos de parafina. Durante esse percurso, em cada submersão o material permaneceu por 1 hora. Após o último banho de parafina, os tecidos foram emblocados em parafina e guardados na geladeira. Posterior ao resfriamento, esses blocos foram cortados e as amostras colocadas em lâminas identificadas com o nome do correspondente tecido do cassete. Essas lâminas, já secas foram encaminhadas para estufa (60°) onde permaneceram por 30 minutos. Logo depois, foram colocadas em três banhos de xilóis consecutivos, soluções de álcoois de diferentes concentrações e submersas em água. Passadas em hematoxilina e eosina, essas mesmas lâminas foram novamente submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações e novamente em três banhos em xilol. Montadas com lamínulas, as lâminas ficaram prontas para a leitura de microscopia. Essa metodologia foi seguida de acordo com o protocolo do laboratório.

4.13 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o teste de *Kruskal-Wallis* no programa *GraphPad Prism 5 Demo* para se comparar os índices obtidos entre os grupos.

REFERÊNCIAS

ADAIR, B. M. et al. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, Kennett, v. 37, p. 943–950, 1993.

ADAIR, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 24, p. 247-255, 2000.

BARRIOS, P. R. et al. Occurrence of chicken anemia vírus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, Campinas, v. 11, n. 2, Apr./June 2009.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495, 1990.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 44, de 23 de agosto de 2001**. Dispõe sobre a aprovação de normas técnicas para o controle de certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *meleagridis*). Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2001.

BRENTANO, A. Anemia infecciosa das galinhas. In: **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 735-762.

BUIM, M. R. et al. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiples PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 552-556, 2009.

CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 2067–2075, 2000.

CHIN, R. P.; GHAZIKHANIAN, G.; KEMPF, I. *Mycoplasma meleagridis* infection. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University, 2003. p. 744-756.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Estudos de prospecção de mercado: safra 2011/2012**. Brasília, 2011.

DAVIDSON, I. et al. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. **Avian Diseases**, Kennett, v. 48, p. 108-118, 2004.

DAVIDSON, I. et al. The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. **Virus Research**, Amsterdam, v. 132, p.152–159, 2008.

DE BOER, G. F. et al. Enhancing effect of chicken anemia agent (CAA) on Marek's disease pathogenesis. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 38., 1989, Tempe. **Proceedings...** Provo: Brigham Young University, 1989. p. 28.

DHAMA, K. et al. Chicken infectious anaemia (CIA): a review. **Indian Journal of Comparative Microbiology Immunology and Infectious Diseases**, New Delhi, v. 23, p. 1–15, 2002.

FARKAS, T. et al. A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 27, p. 316–320, 1998.

FEHLER, F.; WINTER, C. CAV infection in older chickens, an apathogenic infection? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BURSAL DISEASE AND CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA, 2., 2001, Giessen. **Proceedings...** Giessen: Institute für Geflügelkrankheiten, Justus Liebig University, 2001. p. 391-394.

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

GALLARDO, R. A.; VAN SANTEN, V. L.; TORO, H. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 41, n. 5, p. 451-458, 2012.

GELDERBLUM, H. et al. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). **Archives of Virology**, New York, v. 109, p. 115-120, 1989.

GERCHMAN, I. et al. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of Mycoplasma gallisepticum strains isolated from poultry. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 42, p. 90, 2011.

GHOSH, A.; DAS, J.; MANILOFF, J. Lack of repair of UV light damage in *Mycoplasma gallisepticum*. **Journal of Molecular Biology**, London, v.116, p.337-344, 1977.

GIAMBRONE, J. J.; EIDSON, C. S.; KLEVEN, S. H. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *Mycoplasma synoviae*, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 38, p. 251–253, 1977.

GOH, M. S. et al. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). **Microbiology**, New York, v. 144, p. 2971–2978, 1998.

GONÇALVES, P. M. R. **Escherichia coli com detecção do gene iss por PCR, micoplasmas e salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate**. 2005. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

GORYO, M.; OKADA, K. Histopathology in chicks dually inoculated with chicken anemia virus and Marek's disease virus at various ages. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFECTIOUS BURSAL DISEASE AND CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA, 1., 1994, Rauschholzhausen. **Proceedings...** Rauschholzhausen: [s. n.], 1994. p. 392-405.

HANNAN, P. C. T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 31, p. 373-395, 2000.

HARIDY, M. et al. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anaemia virus. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 38, p. 469–483, 2009.

HARIDY, M. et al. Pathological and immunohistochemical studies of subclinical infection of chicken anemia virus in 4-week-old chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 74, n. 6, p. 757-564, Jan. 2012.

HOOP, R. K. Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 21, p. 493–501, 1992.

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

KHIARI, A. B. et al. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from chickens. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 55, n. 1, p. 8-12, 2011

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

KLEVEN, S. H. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. **Poultry Science**, College Station, v. 77, p. 1146-1140, 1998.

KOCH, G. et al. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. **Vaccine**, Kidlington, v. 13, p. 763-770, 1995.

KOGUT, M. H. et al. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 16, n. 2, p. 141-151, Feb. 1994.

KUSCU, B.; GUREL, A. Lesions in the thymus and bone marrow in chicks with experimentally induced chicken infectious anemia disease. **Journal Veterinary of Science**, Suwon, v. 9, n. 1, p. 15-23, Mar. 2008.

LEIGH, S. A. et al. Effect of infection route and concurrent infectious bronchitis virus vaccination on *Mycoplasma gallisepticum* disease pathology in an experimental model. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 41, n. 5, p. 497-503, Oct. 2012.

LEWICKI, J. **Tylosin**: a review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. Warsaw: Warsaw Agricultural University, 2006. 39 p.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames: Blackwell, 2008. p. 807-834.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF, Y. M. et al. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University, 2003. p. 722-744.

LÓPEZ, H. S.; OLVERA, L. G. Consideraciones farmacológicas de la antibioticoterapia en aves. In: _____. **Farmacología clínica en aves comerciales**. New York: Mc Graw-Hill, 2010. 28 p.

MACHADO, L. S. **PCR na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* patogênica em frangos de corte com aerossaculite pela Inspeção Sanitária Federal.** 2010. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

MARÍN, S. Y. et al. Molecular characterization and epidemiology of chicken infectious anemia virus from subsistence and commercial chickens in Minas Gerais, Brazil. In: **WORLD'S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. Proceedings...** Salvador: [s. n.], 2012. v. 1.

MAY, J. D.; BRANTON, S. L. Identification of Mycoplasma isolates by ELISA. **Avian Diseases**, Kennett, v. 41, n. 1, p. 93-96, Jan./Mar. 1997.

MC EWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 3, p. 93-106, 2002.

MC NEILLY, F. et al. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. **Avian Diseases**, Kennett, v. 39, n. 3, p. 532-537, July/Sept. 1995.

MC NULTY, M. S. Chicken anaemia agent: a review. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 20, p. 187-203, 1991.

MC NULTY, M. S. et al. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia agent. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 17, p. 315-324, 1988.

MC NULTY, M. S. et al. Current status of chicken anemia agent. In: **WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 38., 1989, Tempe. Proceedings...** Provo: Brigham Young University, 1989. p. 12-13.

MINHARRO, S. et al. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.

MOHAMED, M. A. Chicken infectious anemia status in commercial Broiler chickens flocks in assiut-upper Egypt: occurrence, molecular analysis using PCR-RFLP and apoptosis effect on affected tissues. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 591-598, 2010.

NAGATOMO, H. et al. Comparative studies of the persistence of animal Mycoplasmas under different environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 223-232, 2001.

NASCIMENTO, E. R et al. Avaliação de antimicrobianos no tratamento da doença respiratória crônica por *Mycoplasma gallisepticum* e *Escherichia coli* em frangos de corte. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, p. 72, 1999. Supl.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I. **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 485-496.

NATESAN, S. et al. Biological and molecular characterization of chicken anaemia virus isolates of Indian origin. **Virus Research**, Amsterdam, v. 118, p. 78–86, 2006.

NOORMOHAMMADI, A. H. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 36, n. 6, p. 439-444, 2007.

NOTEBORN, M. H. M. et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, p. 3131-3139, 1991.

NOTEBORN, M. H. M.; KOCH, G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 24, p. 11–31, 1995.

NOTEBORN, M. H. M.; VAN OORSCHOT, A. A. M. D.; VAN DER EB, A. J. Chicken anemia virus: induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. **Seminars in Virology**, London, v. 8, p. 497–504, 1998.

OLANREWAJU, H. A. et al. Effects of broiler rearing environment on transmission of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* from commercial layer hens to broiler chickens: role of acid-base balance. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 2, n. 2, p. 145-150, 2009.

OTAKI, Y. et al. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chickens vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 16, p. 291-306, 1987.

PAKPINYO, S.; SASIPREEYAJAN, J. Molecular characterization and determination of antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 59-65, Nov. 2007.

PAPAZISI, L. et al. Analysis of cytoadherence-deficient, GapA-negative *Mycoplasma gallisepticum* strain. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 6643–6649, 2000.

PAPAZISI, L. et al. Coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 6839–6845, 2002.

PRINGLE, C. R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. **Archives of Virology**, Wien, v. 144, p. 2065-2070, 1999.

RAMIREZ, A. S. et al. A semi-defined medium without serum for small ruminant mycoplasmas. **The Veterinary Journal**, Philadelphia, v. 178, p. 149-152, 2008.

RAVIV, Z. et al. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 1/2, p. 179-187, 2008.

REUTERS. **Brazil poultry exports should recover in 2013**. Disponível em: <<http://www.reuters.com/article/2013/01/15/brazil-grains-poultry-idUSL2N0AKB6N20130115>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

RHOADES, K. R. Inhibition of avian mycoplasmal hemagglutination by IgM type antibody. **Poultry Science**, College Station, v. 57, n. 3, p. 608-610, 1978.

RODRIGUEZ, R.; KLEVEN, S. H. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens. **Avian Disease**, Kennett, v. 24, p. 800–807, 1980.

ROUSSAN, D. A.; HADDAD, R.; KHAWALDEH, G. Molecular survey of avian respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. **Poultry Science**, College Station, v. 87, n. 3, p. 444-448, Mar. 2008.

RUTZ, F. et al. **Nutrição e qualidade de carne de aves**. 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/nutricao-qualidade-carne-aves-t607/141-p0.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

SANTOS, B. M.; MARIN, S. Y.; BARBOSA, A. C. Confiabilidade de um teste de triagem para micoplasmose aviária. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 18-23, 2007.

SANTOS, S. B. et al. Potentially pathogenic mycoplasmas in the external ear of clinically normal cattle in southeast Brasil: first report. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 455-457, 2009.

SCHAT, K. A. Infectious anemia. In: SAIF, Y. M. et al. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State University, 2003. p.182-202.

SIMIONATTO, S. et al. Um protocolo de 'nested-PCR' para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 106-110, abr./jun. 2005.

SLAVIK, M. F.; WANG, R. F.; CAO, W. W. Development and evaluation of the polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 7, n. 6, p. 459-463, 1993.

SMYTH, J. A. et al. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. **Avian Disease**, Kennett, v. 37, n. 2, p. 324-338, Apr./June 1993.

SPINOSA, H. S. Macrolídeos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2011.

SPRYGIN, A. V. et al. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the description of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 39, n. 2, p. 99-109, 2010.

TAKASE, K. et al. Serological monitoring on layer farms with specific pathogen-free chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 12, p. 1327-1329, Dec. 2000.

TENÓRIO, C. G. M. S. R. **Avaliação da eficiência do teste COPAN (microplate e single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite.** 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

TIMMS, L. M. The effects of infectious bronchitis superimposed on latent *Mycoplasma gallisepticum* infection in adult chickens. **Veterinary Record**, London, v. 91, p. 85, 1972.

TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 29, p. 373–394, 2000.

TORO, H. et al. Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus in commercial chickens. **Avian Disease**, Kennett, v. 53, p. 94–102, 2009.

TORO, H. et al. Pigeon paramyxovirus: association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. **Avian Disease**, Kennett, v. 49, n. 1, p. 92-98, Mar. 2005.

VOGL, G. et al. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 76, n. 1, p. 71-77, 2008.

WEINACK, O. G. et al. Influence of *Mycoplasma gallisepticum*, infectious bronchitis, and cyclophosphamide on chickens protected by native intestinal microflora against *Salmonella typhimurium* or *Escherichia coli*. **Avian Disease**, Kennett, v. 28, p 416–425, 1984.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 7, p. 4238-4244, 2000.

YASHPAL, S. M.; DEVI, P. P.; SAGAR, M. G. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 16, p. 244–248, 2004.

YODER, JÚNIOR, H. W. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University, 1991. p. 198-212.

YUASA, N. et al. Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. **National Institute of Animal Health Quarterly**, Tokyo, v. 23, p. 78–81, 1983.

ZANELLA, A. et al. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In: SCHAT, K. A. (Ed.). **Current progress on marek's disease research**. Kennett: American Association of Avian Pathologists, 2001. p. 1119.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS (Artigos elaborados conforme a norma da revista *Canadian Journal of Veterinary Research* – Versão Preliminar)

ARTIGO1 COINFECÇÃO EXPERIMENTAL COM ESTIRPES VACINAIS DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM *Mycoplasma gallisepticum* EM AVES SPF

Carolina Fontes Prezotto^{1,*}, Priscilla Rochele Barrios², Ana Paula Peconick², Raimundo Vicente deSousa¹

¹Setor de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras; ² Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras

* Autor de correspondência(Tel.: +55-35-3829-1148; fax: +55-35-3829-1735; E-mail: carolpre@yahoo.com.br)

Resumo

Mycoplasma gallisepticum (MG) é importante causador de aerossaculite em frangos e galinhas, o que acarreta prejuízos para a cadeia produtora de frangos de corte. MG pode se associar a outros agentes causadores de transtornos respiratórios e/ou imunodepressores. Dentre os agentes causadores de imunodepressão, o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) tem grande destaque. Dessa forma esse trabalho teve como objetivo avaliar os sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas da coinfeção experimental com cepas vacinais entre o MG e o CAV. Foram analisados 3 grupos, sendo o grupo 1 controle negativo para CAV e MG; o grupo 2, grupo positivo para MG e o grupo 3, grupo positivo para CAV e MG. A coinfeção foi comprovada através de análises estatísticas de lesões macroscópicas de traqueia, timo e sacos aéreos com o teste de Kruskal-Wallis e detecção molecular de fragmentos genéticos dos agentes nos tecidos alvo. Houve significativa diferença nas lesões de traqueia, timo e sacos aéreos do grupo 3 quando comparado aos grupos 1 e 2 ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas nas lesões entre os grupos 1 e 2. Foi possível obter-se coinfeção dos pintinhos SPF com as cepas vacinais de CAV e MG.

Palavras-Chave: CAV. Coinfeção. Micoplasmose.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo *Mycoplasma gallisepticum*(MG), um dos agentes causadores da doença crônica respiratória (DCR) nas aves, é responsável por mortalidade, redução no ganho de peso e redução na produção de ovos, sendo importante causador de aerossaculite em frangos, o que acarreta prejuízos para a cadeia produtora de frangos de corte (Ley, 2003; Yashpal et al., 2004; Evans et al., 2005; Nascimento e Pereira, 2009). O MG pode causar a doença assim como pode se associar a outros agentes causadores de transtornos respiratórios como bactérias e vírus (Yashpal et al., 2004). O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) é um importante agente imunodepressor que pode predispor as aves a infecções secundárias, uma vez que atua tanto em células na medula óssea quanto em linfócitos no timo comprometendo assim uma resposta imune adequada a infecções por outros patógenos (Brentano, 2009; Toro et al., 2009 e Gallardo et al., 2012). Isso pode representar grandes perdas econômicas para a produção de frangos (Lütticke, 1997). Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar os sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas da coinfeção experimental entre o MG e o CAV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas 15 aves livres de patógenos específicos (SPF) que foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos com cinco aves cada. Ovos SPF certificados foram alojados em uma incubadora modelo PS *premium* ecológica LTDA até o nascimento dos pintinhos. Com um dia de vida, os pintinhos foram realocados para um isolamento onde permaneceram até o dia de abate. Essas aves receberam água e ração *ad libitum* livre de promotores de crescimento e coccidiostáticos. Esse projeto foi previamente aprovado por um Comitê de Ética.

2.2 *Mycoplasma gallisepticum*

Uma vacina viva atenuada com a cepa MgF (Biovet, São Paulo) foi reconstituída e cultivada em meio de Frey (Frey et al., 1968) até a obtenção de uma densidade de 3×10^{13} UFC/0,1 ml.

2.3 CAV

Uma vacina viva atenuada com a cepa *Cuxhaven* (Cux-1) (*Lohmann Animal Health*, Alemanha) foi reconstituída até obter-se $10^{2,3}$ doses infectantes por mL para 50% dos cultivos celulares (DICC50%).

2.4 Protocolo experimental

Pintos de ovos SPF certificados com um dia de vida foram divididos em três grupos de cinco aves. Com um dia de vida, essas aves foram inoculadas, sendo que o grupo controle negativo (1) e o grupo controle positivo para MG (2) receberam 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato por via intraperitoneal e o grupo três, nesse mesmo dia, foi inoculado com 0,2 mL da vacina viva atenuada de CAV com $10^{2,3}$ doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares (DICC50%), por via intraperitoneal. Após corridos oito dias dessa primeira inoculação, mais uma inoculação ocorreu nos grupos 2 e 3, porém com 0,2 mL da cepa de MgF vacinal, sendo que o grupo controle negativo (1) foi inoculado com apenas o caldo de meio de Frey, sem presença de micoplasmas. Desses 0,2mL inoculados, 0,1 ml foi aplicado intraperitonealmente e 0,1 ml via intranasal.

Dessa forma, os tratamentos ficaram assim estipulados: (1): Controle negativo (solução salina, sem inoculação de CAV, sem inoculação de MG); (2): Controle positivo para MG (sem inoculação de CAV, com inoculação de MG); (3): Controle positivo para MG e CAV (inoculação de CAV e inoculação de MG).

Após 15 dias da última inoculação foi realizado o abate sanitário das aves, onde foi coletado material para PCR (timo e traqueia) e também material para histopatologia (timo, traqueia, fígado e baço).

2.5 Escore de lesões

Na necropsia foi realizada uma análise das lesões macroscópicas, sendo elas classificadas de acordo com tabela de score de lesões descritas por Kogut et al. (1994) modificado, mostradas a seguir:

- Escore de lesão da traqueia: 1- sem alterações; 2 – presença de muco; 3 – muco e áreas hiperêmicas; 4 – exsudato catarral e hemorragias; 5 – obstrução parcial e/ou completa da traqueia e morte.
- Escore de lesão dos sacos aéreos: 1 – sem alterações; 2 – alteração de espessura; 3 – alteração de espessura e opacidade; 4 – presença de bolhas e acúmulo de exsudato; 5 – deposição de fibrina.
- Escore de lesão do timo: 1 – sem alterações; 2 – pouca redução de tamanho; 3 – clara redução de tamanho; 4 – ausência de alguns lobos nos dois lados do pescoço; 5 – completa atrofia.

2.6 Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos (traqueia e timo) foi feita pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom et al. (1990). Após centrifugação e coleta do DNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C .

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *NanoVue®* (*GE, Healthcare, Reino Unido*) a 260nm, 280nm e sua razão.

2.7 Oligonucleotídeos Iniciadores

Na PCR para CAV foram usados os iniciadores descritos por Marín et al. (2010) CAVMGF 5'CCTGTTCCGACACATTGA3' correspondendo aos nucleotídeos 1444 a 1461 e o CAVMGR 5'TATGGCCTCTGCCTGTTA3' que corresponde aos nucleotídeos 2119 a 2136. A posição dada aos nucleotídeos no genoma completo do CAV foi de acordo com a sequência da estirpe Cuxhaven-1 (M55918.1 *GenBank*). Já na PCR para MG foram utilizados os iniciadores recomendados pela OIE MG-14F 5' GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3' e MG-13R 5'GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC3'.

De acordo com protocolo de Marín et al. (2010) para PCR de CAV uma alíquota de cada amostra de DNA total obtida da extração dos timos. Foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: 200ng de DNA, tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 0,4mM de dNTP, 2mM de MgCl₂, 1 µL de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase – *Invitrogen*) e água ultra pura 18,2 Mili-Q q.s.p.

De acordo com protocolo da OIE para PCR de MG uma alíquota de 5 µL de cada amostra de DNA total obtida da extração das traqueias foi utilizada na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: 35,75 µL de água Mili-Q, tampão 10X(200mM tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 1 µL de dNTP, 0,5 µL de cada iniciador a 20 pmol/ µL, 0,25 UI de Taq Polimerase e 2 µL de MgCl₂.

2.8 Histopatologia

Transcorridas 48 horas da coleta do material, as amostras foram clivadas e colocadas em cassetes identificados com o nome do órgão correspondente e colocados no aparelho histotécnico para o processamento e fixação. Durante o processamento, as amostras foram submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), posteriormente também submersas em xilóis e finalmente em dois banhos de parafina. Durante esse percurso, em cada submersão o material permaneceu por 1 hora. Após o último banho de parafina, os tecidos foram emblocados em parafina e guardados na geladeira. Posterior ao resfriamento, esses blocos foram cortados e as amostras colocadas em lâminas identificadas com o nome do correspondente tecido do cassete. Essas lâminas, já secas foram encaminhadas para estufa (60°) onde permaneceram por 30 minutos. Logo depois, foram colocadas em 3 banhos de xilóis consecutivos, soluções de álcoois de diferentes concentrações e submersas em água. Passadas em hematoxilina e eosina, essas mesmas lâminas foram

novamente submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações e novamente em três banhos de xilóis. Montadas com lamínulas ficaram prontas para a leitura de microscopia. Essa metodologia foi seguida de acordo com o protocolo do laboratório.

2.9 Estatística

As análises estatísticas de escore de lesões macroscópicas em traqueia, sacos aéreos e timo foram realizadas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

3 RESULTADOS

Na avaliação dos sinais clínicos das aves não foi possível verificar alterações dignas de nota entre os grupos, porém decorridos 8 dias da inoculação com MG, houve duas mortalidades de aves do grupo 3. Na necropsia puderam ser observadas alterações macroscópicas como timo reduzido de tamanho, traqueia hemorrágica com exsudato catarral obstruindo as via aéreas superiores. Além disso, observou-se também a presença de aerossaculite e pericardite, baço reduzido de tamanho e pulmão com áreas esbranquiçadas.

Como pôde ser observado no teste de Kruskal-Wallis, obteve-se diferença significativa nas análises das lesões macroscópicas tanto de traqueia ($p < 0,01$), quanto de sacos aéreos ($p < 0,01$) e do timo ($p = 0,001$) do grupo 3 comparado aos grupos 1 e 2 (Figura 1, 2 e 3 respectivamente). Porém, em nenhum momento foi observado alterações significativas nas lesões macroscópicas desses mesmos tecidos entre os grupos 1 e 2 (Figuras 1, 2 e 3).

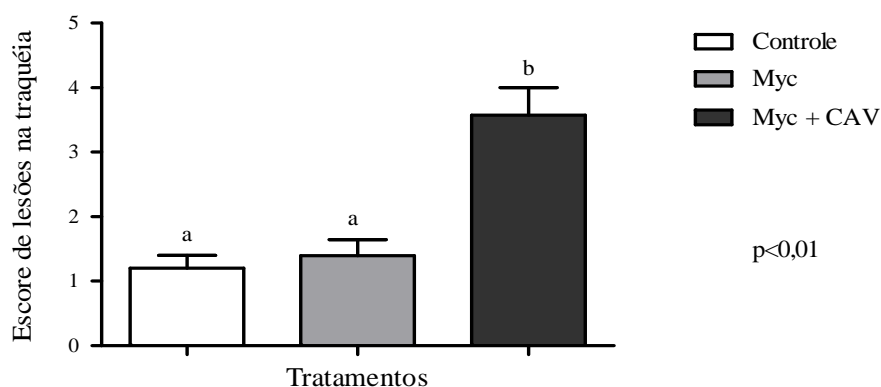


Figura 1 Escore de lesões macroscópicas de traqueia encontradas na necropsia das aves realizada 15 dias após inoculação com MG. Em branco apresenta-se o grupo (1) controle negativo; em cinza está o grupo controle positivo para MG (2) e em preto está o grupo 3 positivo para CAV e MG. ($p < 0,01$)

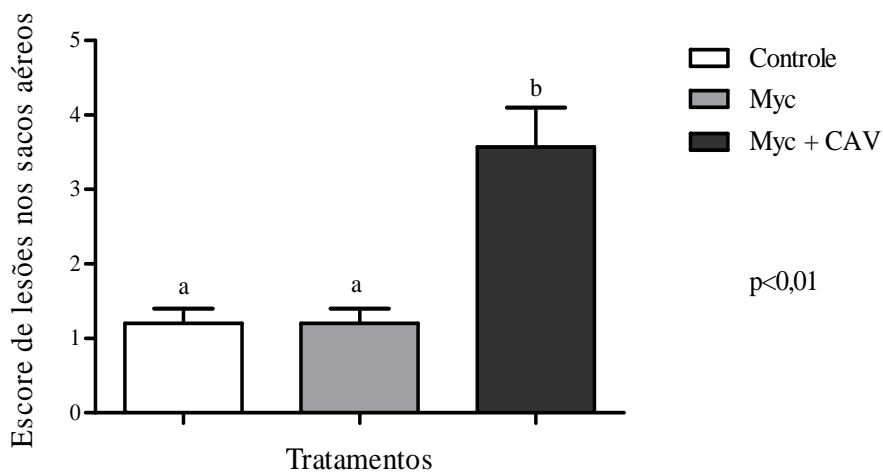


Figura 2 Escore de lesões macroscópicas de sacos aéreos nas aves abatidas 15 dias após inoculação com MG. Em branco apresenta-se o grupo (1) controle negativo; em cinza está o grupo controle positivo para MG (2) e em preto está o grupo 3 positivo para CAV e MG. (p < 0,01)

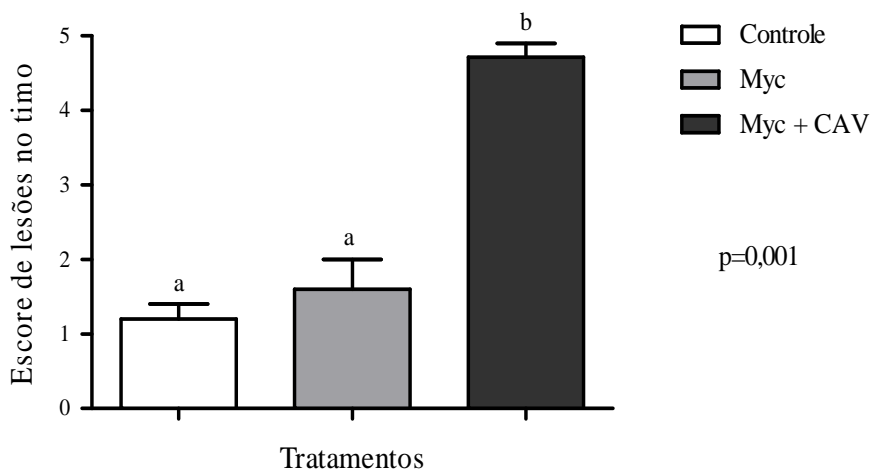


Figura 3 Escore de lesões macroscópicas nos timos nas aves abatidas 15 dias após inoculação com MG. Em branco apresenta-se o grupo (1) controle negativo; em cinza está o grupo controle positivo para MG (2) e em preto está o grupo 3 positivo para CAV e MG. (p = 0,001)

Na histopatologia, as lâminas de traqueia do grupo 1 apresentaram epitélio normal, com presença de cílios e células caliciformes no corte como um todo. Além disso, não foram observadas alterações no timo, fígado e baço. Nos cortes de traqueia do grupo 2, notou-se que o epitélio se encontrava mais delgado e presença de cílios com certa escassez em três aves e duas aves apresentaram corte com poucas alterações, distribuição mais uniforme de epitélio e presença de cílios. Por fim, no grupo 3 todo o epitélio das 5 lâminas analisadas apresentaram alguma alteração de espessura, aumento do número de células caliciformes e cobertura ciliar escassa a ausente.

No resultado da PCR, foi detectada a presença de ácido nucleico de MG nos grupos 2 e 3 tanto nas amostras de traqueia quanto nas amostras de sacos aéreos. A presença de ácido nucleico de CAV foi observada apenas nas amostras de timo do grupo 3. O grupo 1 obteve-se resultado negativo tanto para a pesquisa de CAV quanto para MG.

4 DISCUSSÃO

Sabe-se que algumas doenças imunodepressoras podem afetar a produção de frango uma vez que aumentam a susceptibilidade das aves a outras doenças causadas por vírus e bactérias oportunistas (Lutticken, 1997; Balamurugan & Kataria, 2006). Dentre os conhecidos agentes importantes causadores de doenças imunodepressoras, o CAV destaca-se por estar presente em produções no mundo todo, não só em aves comerciais como em aves de subsistência e também em criações de aves SPF (Schat, 2003; Balamurugan & Kataria, 2006; Barrios et al., 2009). Uma vez que esse vírus tem tropismo por linfócitos T do timo, a resposta imune, principalmente contra agentes intracelulares mediadas pelas células TCD8+, torna-se comprometida (Adair, et al., 1993; Adair, 2000; Brentano, 2009). O MG é um conhecido patógeno intracelular, essa característica possibilita uma maior distribuição sistêmica e uma vantagem na proteção contra o sistema imune (Vogl et al., 2008; Santos et al., 2009). Ao realizarem-se as necropsias dos grupos, foi vista notável diferença entre as aves do grupo 3 quando comparado aos demais grupos (Figuras 1, 2 e 3). Logo, pode-se afirmar que a coinfeção ocorreu sendo que as lesões macroscópicas causadas por MG foram agravadas pela presença de o CAV como agente imunodepressor, como notada a diferença significativa entre os grupos 2 e 3 (Figura 1: $p < 0,01$).

A grave atrofia do timo foi vista em todas as aves infectadas com a cepa vacinal de CAV, enquanto os grupos 1 e 2 mantiveram-se sem alterações nesse órgão, demonstrado na Figura 3 ($p = 0,001$). Como o abate foi realizado 23 dias após a inoculação de CAV vacinal, não foram observadas alterações microscópicas importantes nos órgãos alvo desse vírus, pois sabe-se que ocorre uma recuperação do tecido 18 a 26 pós-infecção viral, sendo dificilmente encontrada alguma lesão (Smyth et al., 1993), corroborando com resultados encontrados

neste estudo. Mesmo havendo recuperação tecidual, ainda assim, o ácido nucleico de CAV foi encontrado nas amostras extraídas de timo em todas as aves do grupo 3.

De acordo com o estudo realizado, lesões de traqueia puderam ser observadas no grupo 2 porém em menor gravidade quando comparado ao grupo 3 (Figura 1: $p < 0,01$) tanto macroscopicamente quanto microscopicamente. Apesar do ácido nucleico de MG ter sido encontrado nos dois grupos, as alterações moderadas nas lâminas do grupo 2 mostraram que apesar de haver uma colonização do MG vacinal na traqueia, ela foi em menor intensidade quando comparado às lesões encontradas nos cortes de traqueia do grupo 3. Esse grupo apresentou-se com rarefação de cílios e células caliciformes alteradas já encontrados em outros trabalhos como de Murakami et al. (2002). De acordo com Gaunson et al. (2000), as células TCD8+ apresentam importante papel na patogenia da infecção por *Mycoplasma gallisepticum*. Como é relatado em literatura, essas células de defesa também são susceptíveis à CAV (Adair et al., 1993; Adair, 2000; Brentano, 2009), logo acredita-se que a coinfeção desses dois agentes permitiu que o MG se instala-se com maior facilidade no trato respiratório das aves do grupo 3, causando lesões mais graves do que quando comparado ao grupo 2. Além disso, os sacos aéreos mostraram-se mais comprometidos no grupo 3 do que no grupo 2. De acordo com a Figura 2, a aerossaculite esteve mais presente nas aves do grupo 3, quando comparado aos grupos 1 e 2 ($p < 0,01$).

CAV e MG são amplamente distribuídos na avicultura mundial e esse estudo demonstrou, com o desenvolvimento de lesões macroscópicas e microscópicas, que é possível coinfeção entre estirpes vacinais desses agentes. Coinfecções de CAV e MG com outras bactérias e vírus a campo são comumente relatadas em literatura (McNeily et al., 1995; Kleven, 1998; Zanella et al., 2001; Toro et al., 2009). A cepa MGF vacinal já foi relatada antes como passível de causar doença no trato respiratório superior das aves, sendo que essa resposta pode ser exacerbada quando há a presença de infecções secundárias concomitantes (Lin & Kleven, 1982; Yoshida et al., 2000). Sendo assim é possível que a campo, em condições adequadas, possa haver uma coinfeção natural com cepas mais virulentas, causando perdas importantes para a produção avícola. Atualmente na avicultura são utilizadas vacinas na prevenção de muitas doenças, sendo que vacinas atenuadas são comercializadas para CAV e MG (Balamurugan & Kataria, 2006; Javed, et al., 2005). Assim, a correta imunização das aves, tanto no que diz respeito à idade, dose e combinação de vacinas, é imprescindível, pois mesmo estirpes atenuadas podem, em uma coinfeção, ser responsáveis por lesões importantes levando à perda no desempenho das aves e prejuízos econômicos.

REFERÊNCIAS

- Adair B.M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Develop. Comp. Immunol.* 24:247-255. 2000
- Adair, B. M., McNeilly, F., McConnell, C. D. G. and McNulty, M. S. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 37: 943–950. 1993.
- Balamurugan, V & Kataria, JM. Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken—Current Status. *Veterinary Research Communications*, 30, 541–566. 2006.
- Barrios, PR, Marin, SY, Resende, M, Rios, RL, Resende, JS, Horta, RS, Costa, MP, Martins, NRS. Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* vol.11 no.2 Campinas Apr./June 2009.
- Boom, R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28(3):495. 1990.
- Brentano, A. Anemia infecciosa das galinhas. In: *Doença das Aves*. Editora Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas. p. 735-762. 2ª ed. 2009.
- EVANS, R.D., TRITES, J.D., COCHRANE, R.L. Field evaluation of tylosin premix in layers previously vaccinated with a live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Avian Diseases*. v.46, n.1, p.208-214, 2002.
- Frey, M.L., R.P. Hanson and D.P. Anderson. A medium for the isolation of avian *Mycoplasmas*. *Am. J. Vet. Res.*, 29: 2163-2171. 1968.
- Gallardo RA, van Santen VL, Toro H. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift. *Avian Pathol.* Oct;41(5):2012.
- Gaunson JE, Philip CJ, Whithear KG, Browning GF. Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiology*, 146, 1223–1229. 2000.
- Goryo, M. & Okada, K. Histopathology in chicks dually inoculated with chicken anemia virus and Marek's disease virus at various ages. In *International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia* (pp. 392-405). Rauschholzhausen, Germany. 1994.
- Javed MA, Frasca S Jr, Rood D, Cecchini K, Gladd M, Geary SJ, Silbart LK. Correlates of immune protection in chickens vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* strain GT5 following challenge with pathogenic *M. gallisepticum* strain R(low). *Infect Immun.* Sep;73(9):5410-9. 2005.
- KLEVEN, S.H. *Mycoplasmas* in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poult. Sci.* v.77, p.1146-1140, 1998.
- Kogut MH, Tellez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microb Pathog.* Feb;16(2):141-51. 1994.
- Ley, DH. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press; 2003. P.722-744.

- Lin MY, Kleven SH. Egg transmission of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Dis.* Jul-Sep;26(3):487-95. 1982.
- Lütticken D. Viral diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination. *Acta Vet Hung.* 45(3):239-49. 1997.
- Marin, Sandra Y ; Barrios, P.R. ; Rios, RL ; Resende, M ; Resende, J.S. ; SANTOS, B. M. ; MARTINS, N. R. S. . Molecular characterization and epidemiology of chicken infectious anemia virus from subsistence and commercial chickens in Minas Gerais, Brazil. In: World Poultry Congress 2012, 2012, Salvador. *World Poultry Science Journal.* Salvador: World Poultry Congress, 2012. v. 1. p. 1-1.
- McNeilly F, Smyth JA, Adair BM, McNulty MS Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.* Jul-Sep;39(3):532-7. 1995
- MURAKAMI S, MIYAMA M, OGAWA A, SHIMADA, J, NAKANE T. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium* sp. Infection. *Avian Pathology*, v.31, n.4, p.363-370, 2002.
- Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A. Micoplasmoses. In: Di Fabio, J, Rossini, L.I. *Doenças das aves.* Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2009., p.485-496.
- SANTOS, S.B., NASCIMENTO, E.R., FACCINI, J.L.H., BARRETO, M.L., PEREIRA, V.L.A. Potentially pathogenic mycoplasmas in the external ear of clinically normal cattle in southeast Brasil: first report. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.455-457, 2009.
- Schat KA: Chicken Infectious Anemia. In *Diseases of Poultry.* 11th edition. Edited by Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Ames, Iowa: Iowa State University Press;182–202. 2003.
- Smyth JA, Moffett DA, McNulty MS, Todd D, Mackie DP. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis.* Apr-Jun;37(2):324-38. 1993.
- Toro, H., van Santen, V.L., Hoerr, F.J., Breedlove, C. Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus in commercial chickens. *Avian Dis.* 53, 94–102. 2009.
- VOGL, G., PLAICKNER, A., SZATHMARY, S., STIPKOVITS, L., ROSENGARTEN, R., SZOSTAK, M.P. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infection and Immunity*, v.76, n.1, p.71-77, 2008.
- Yashpal, S. M., P. P. Devi, and M. G. Sagar. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:244–248. 2004.
- Zanella, A., Dall'Ara, P., Lavazza, A., Marchi, R., Morena, M.A., Rampin, T., et al. Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In K.A. Schat, R.M. Morgan, M.S. Parcells, & J.L. Spencer (Eds.), *Current Progress on Marek's Disease Research* (pp. 1119). Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists. 2001.

ARTIGO2 AVALIAÇÃO DE DUAS DOSES DE UMA TILOSINA BASE COMERCIAL A SER ADMINISTRADA VIA ÁGUA DE BEBIDA PARA FRANGOS DE CORTE NO TRATAMENTO DE INFECÇÃO POR *Mycoplasma gallisepticum*

Carolina Fontes Prezotto^{1,*}, Priscilla Rochele Barrios², Ana Paula Peconick², Raimundo Vicente de Sousa¹

¹Setor de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras; ²Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras

* Autor de correspondência(Tel.: +55-35-3829-1148; fax: +55-35-3829-1735; E-mail: carolpre@yahoo.com.br)

Resumo

O Brasil encontra-se como um dos maiores produtores de frango do mundo, porém, sabe-se que de toda a carne de frango produzida anualmente no Brasil, cerca de 30 mil toneladas são perdidas por condenações devido a problemas respiratórios causados principalmente por micoplasmoses, especialmente a aerossaculite. Os macrolídeos, como a tilosina, são utilizados no tratamento de micoplasmoses por atuarem na inibição da síntese de proteínas. A tilosina pode ser comercializada sob a forma de sal de fosfato, sal de tartarato e base. Devido às limitações no uso dos sais, assim como no uso da tilosina base via intramuscular este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de duas diferentes doses de uma tilosina base comercial administrada via água de bebida, em reduzir as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo MG. Os grupos usados no estudo foram grupo (1), controle negativo; (2) controle positivo para MG e CAV; (3) controle positivo para MG e CAV e dose de tilosina base D1 e (4) controle positivo para MG e CAV e dose de tilosina base D2. Como resultado obteve-se diferença significativa ($p < 0,01$) na redução das lesões de traqueia e sacos aéreos com a dose dos grupos 3 e 4 quando comparadas aos outros grupos.

Palavras-chave: *Mycoplasma gallisepticum*. Tilosina. Aerossaculite.

1. INTRODUÇÃO

Ao lado dos Estados Unidos e China, o Brasil encontra-se como um dos maiores produtores de frango do mundo, porém, sabe-se que de toda a carne de frango produzida anualmente no Brasil, cerca de 30 mil toneladas são perdidas por condenações devido a problemas respiratórios causados principalmente por micoplasmoses, tais condenações acarretam um prejuízo anual de cerca de 30 milhões de dólares (Nascimento, et al., 2005). A infecção pelo *Mycoplasma gallisepticum* (MG), um dos agentes causadores da doença crônica respiratória (DCR) nas aves, é responsável por mortalidade, redução no ganho de peso e redução na produção de ovos, sendo importante causador de aerossaculite em frangos, o que acarreta prejuízos para a cadeia produtora de frangos de corte (Ley, 2003; Yashpal et al., 2004; Evans et al., 2005; Nascimento e Pereira, 2009). Os macrolídeos, entre eles a tilosina, atuam inibindo a síntese de proteínas através de sua ligação ao 23S rRNA, que é componente da subunidade ribossômica 50S dos micro-organismos susceptíveis (Gerchman et al., 2011), dessa forma são amplamente utilizados no tratamento de micoplasmoses (Lewicki, 2006; Spinosa, 2009), que causam perdas consideráveis na indústria avícola (Yoder Jr., 1991; Charlton et al., 1996; Lay & Yoder Jr, 1997). A tilosina pode se apresentar como sal de tartarato que é hidrossolúvel, sal de fosfato adicionado no alimento (López & Olvera, 2010) e tilosina base. A má absorção do fosfato faz com que haja menor disponibilidade sérica dessa forma de apresentação da tilosina, sendo recomendado o aumento da dose a ser utilizada. Já sob a forma de sal de tartarato, indica-se o uso principalmente na água potável, porém, mesmo dessa maneira continua tendo uma atuação inferior a outros antibióticos como a tiamulina (Lewicki, 2006). Como não há estudos sobre administração de tilosina base por via oral, este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de duas diferentes doses de uma tilosina base comercial administrada via água de bebida, em reduzir as lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelo MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas 20 aves livres de patógenos específicos (SPF) distribuídas aleatoriamente em quatro tratamentos de 5 aves. Ovos SPF certificados foram alojados em uma incubadora modelo PS *premium* ecológica Ltda. até o nascimento dos pintinhos. Com um dia de vida, os pintinhos foram realocados para um isolamento onde permaneceram até o dia de abate. Essas aves receberam água e ração *ad libitum* livre de promotores de crescimento e coccidiostáticos.

2.2 *Mycoplasma gallisepticum*

Uma vacina viva atenuada com a cepa MgF foi diluída e cultivada em meio de Frey (Frey et al., 1968) até ter sido obtida uma densidade de 3×10^{13} UFC/0,1 ml.

2.3 CAV

Uma vacina viva atenuada com a cepa *Cuxhaven* foi diluída até obter-se $10^{2,3}$ doses infectantes dos para 50 % dos cultivos celulares (DICC50%).

2.4 Protocolo experimental

Pintos de ovos SPF certificados com um dia de vida foram divididos em 4 grupos de 5 aves cada. A coinfeção de CAV com MG foi realizada conforme artigo anterior, então com um dia de vida, as aves foram inoculadas, sendo que o grupo controle negativo (1) recebeu 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato por via intraperitoneal e os outros grupos, nesse mesmo dia, foram inoculados com 0,2 mL da vacina viva atenuada de CAV com 102,3 doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares (DICC50%), por via intraperitoneal. Após corridos oito dias dessa primeira inoculação, uma segunda inoculação ocorreu nos grupos 2, 3 e 4, porém com 0,2 mL da cepa de MgF vacinal, sendo que o grupo controle negativo (1) foi inoculado com apenas o caldo de meio de Frey, sem presença de micoplasmas. Desses 0,2mL inoculados, 0,1 ml foi aplicado intraperitonealmente e 0,1 ml via intranasal.

Dessa forma, os tratamentos ficaram assim estipulados: 1 - Controle negativo; 2 - Controle positivo para MG e CAV; 3 - Controle positivo para MG e CAV e dose de tilosina base 60mg/kg a cada 24 horas via água de bebida (D1); 4 - Controle positivo para MG e CAV e dose de tilosina base 400mg/L trocada a cada 24 horas via água de bebida (D2).

Após 10 dias da inoculação com a cepa de MG vacinal, foi iniciado o tratamento por 5 dias com uma tilosina base dos tratamentos 3 e 4. O grupo 3 recebeu a dose de 30mg/kg via água de bebida a cada 12 horas e o grupo 4 foi administrada a tilosina base na dose de 400mg/L, sendo que essa água era trocada a cada 24 horas.

Um dia após o término dos tratamentos, foi realizado o abate sanitário das aves de todos os grupos, onde foi coletado o material para PCR (timo, traqueia e sacos aéreos) e também a traqueia foi coletada para histopatologia.

2.5 Escore de lesões

Na necropsia foi realizada uma análise das lesões macroscópicas, sendo elas classificadas de acordo com tabela de score de lesões descritas por Kogut et al. (1994) modificado, mostradas a seguir:

- Escore de lesão da traqueia: 1- sem alterações; 2 – presença de muco; 3 – muco e áreas hiperêmicas; 4 – exsudato catarral e hemorragias; 5 – obstrução parcial e/ou completa da traqueia e morte.
- Escore de lesão dos sacos aéreos: 1 – sem alterações; 2 – alteração de espessura; 3 – alteração de espessura e opacidade; 4 – presença de bolhas e acúmulo de exsudato; 5 – deposição de fibrina.
- Escore de lesão do timo: 1 – sem alterações; 2 – pouca redução de tamanho; 3 – clara redução de tamanho; 4 – ausência de alguns lobos nos dois lados do pescoço; 5 – completa atrofia.

2.6 Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos (traqueia e timo) foi feita pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom et al. (1990) com modificações. Após centrifugação e coleta do DNA, as amostras foram estocadas em *freezer* a -20°C.

2.7 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro *NanoVue®* (*GE, Healthcare*, Reino Unido) a 260nm, 280nm e sua razão.

2.8 Oligonucleotídeos Iniciadores

Na PCR para CAV foram usados os iniciadores descritos por Marín et al. (2010) CAVMGF 5'CCTGTTCCGACACATTGA3' correspondendo aos nucleotídeos 1444 a 1461 e o CAVMGR 5'TATGGCCTCTGCCTGTTA3' que corresponde aos nucleotídeos 2119 a 2136. A posição dada aos nucleotídeos no genoma completo do CAV foi de acordo com a sequência da estirpe Cuxhaven-1 (M55918.1 *GenBank*). Já na PCR para MG foram utilizados os iniciadores recomendados pela OIE MG-14F 5' GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3' e MG-13R 5'GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC3'.

2.9 Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR)

De acordo com protocolo de Marín et al. (2010) para PCR de CAV uma alíquota de cada amostra de DNA total obtida da extração dos timos. Foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: 200ng de DNA, tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 0,4mM de dNTP,

2mM de $MgCl_2$, 1 μL de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de Taq Polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase – *Invitrogen*) e água ultra pura 18,2 Mili-Q q.s.p.

De acordo com protocolo da OIE para PCR de MG uma alíquota de 5 μL de cada amostra de DNA total obtida da extração das traqueias foi utilizada na reação de amplificação, com volume final de 50 μL contendo: 35,75 μL de água Mili-Q, tampão 10X(200mM tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 1 μL de dNTP, 0,5 μL de cada iniciador a 20 pmol/ μL , 0,25 UI de Taq Polimerase e 2 μL de $MgCl_2$.

2.10 Histopatologia

Transcorridas 48 horas da coleta do material, as amostras foram clivadas e colocadas em cassetes identificados com o nome do órgão correspondente e colocados no aparelho histotécnico para o processamento e fixação. Durante o processamento, as amostras foram submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), posteriormente também submersas em xilóis e finalmente em dois banhos de parafina. Durante esse percurso, em cada submersão o material permaneceu por 1 hora. Após o último banho de parafina, os tecidos foram emblocados em parafina e guardados na geladeira. Posterior ao resfriamento, esses blocos foram cortados e as amostras colocadas em lâminas identificadas com o nome do correspondente tecido do cassete. Essas lâminas, já secas foram encaminhadas para estufa (60°) onde permaneceram por 30 minutos. Logo depois, foram colocadas em 3 banhos de xilóis consecutivos, soluções de álcoois de diferentes concentrações e submersas em água. Passadas em hematoxilina e eosina, essas mesmas lâminas foram novamente submersas em soluções alcoólicas de diferentes concentrações e novamente em três banhos de xilóis. Montadas com lamínulas ficaram prontas para a leitura de microscopia. Essa metodologia foi seguida de acordo com o protocolo do laboratório.

2.11 Estatística

As análises estatísticas de escore de lesões macroscópicas em traqueia, sacos aéreos e timo foram realizadas de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

3 RESULTADOS

Conforme demonstrado na Figura 1 abaixo, o grupo controle (1) foi diferente apenas do grupo 2. Enquanto as duas doses da tilosina base não mostraram

diferenças significativas entre si, nota-se que esses dois grupos mostraram melhor redução no escore de lesões comparado ao grupo sem tratamento (2) ($p < 0,01$). Na comparação dos escores obtidos das lesões nos sacos aéreos (Figura 2), os grupos 3 e 4 também não mostraram diferença entre si e quando comparados ao grupo 1. Porém, as doses de tilosina base administradas no grupo 3 e no grupo 4 mostraram-se bem eficazes na redução dos escores de lesões quando comparadas com a coinfeção sem o tratamento ($p < 0,01$).

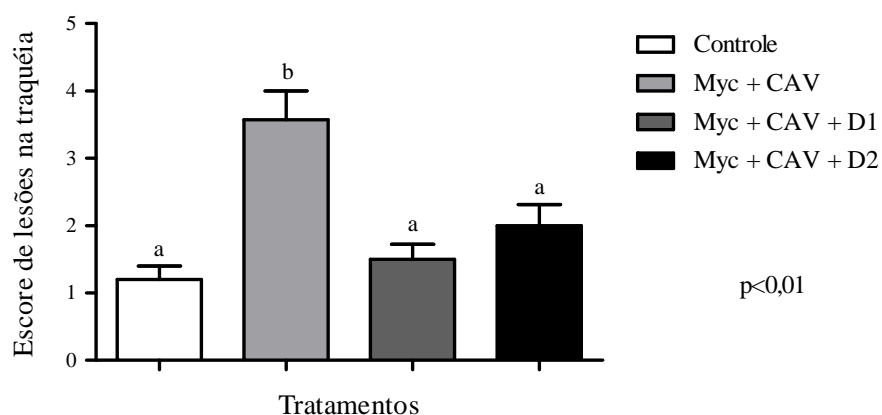


Figura 1 Escore de lesões macroscópicas na traqueia observada na necropsia das aves. Onde em branco está o grupo 1 (controle negativo), em cinza claro o grupo 2 (controle positivo CAV + MG, sem tratamento), em cinza escuro o grupo 3 (positivo para CAV + MG e tratado com D1) e em preto o grupo 4 (positivo para CAV + MG e tratado com D2). $p < 0,01$

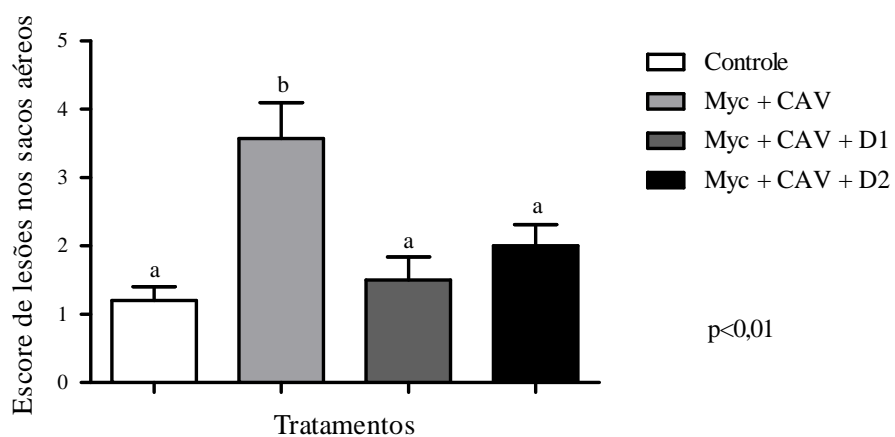


Figura 2 Escore de lesões macroscópicas nos sacos aéreos observadas na necropsia das aves, em branco está o grupo 1 (controle negativo), em cinza claro o grupo 2 (controle positivo CAV + MG, sem tratamento), em cinza escuro o grupo 3 (positivo para CAV + MG e tratado com D1) e em preto o grupo 4 (positivo para CAV + MG e tratado com D2). $p < 0,01$

Na Figura 3, como observado em outro experimento de coinfeção utilizando cepa vacinal (artigo 1), os grupos que foram inoculados com CAV vacinal (2, 3 e 4) apresentaram redução significativa para o grupo sem imunodepressão ($p < 0,01$).

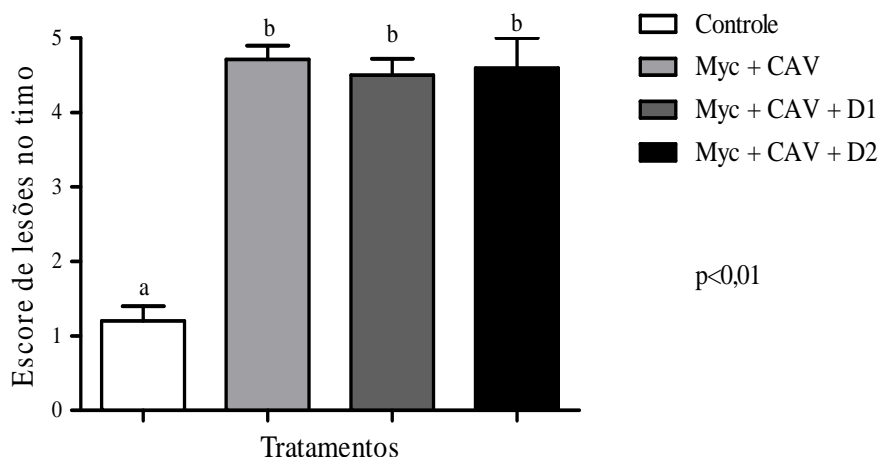


Figura 3 Escore de lesões macroscópicas nos timos observadas na necropsia das aves e em branco está o grupo 1 (controle negativo), em cinza claro o grupo 2 (controle positivo CAV + MG, sem tratamento), em cinza escuro o grupo 3 (positivo para CAV + MG e tratado com D1) e em preto o grupo 4 (positivo para CAV + MG e tratado com D2). $p < 0,01$

Nas lesões histopatológicas, o grupo 1 apresentou-se com tecido predominantemente normal, com cílios ao longo do corte e presença de células caliciformes. No grupo 2 todo o epitélio das lâminas analisadas apresentou alguma alteração de espessura da mucosa, aumento do número de células caliciformes e cobertura ciliar escassa a ausente. O grupo 3 mostrou-se com poucas alterações, cílios cobrindo quase todo o corte e epitélio conservado assim como o grupo 4, com exceção de dois animais que apresentaram a traqueia com alterações microscópicas moderadas.

Na PCR, o grupo 1 não foi obtido resultados positivos para a pesquisa de ácido nucleico tanto do MG quanto de CAV. Já nos grupos 2, 3 e 4, tanto CAV quanto MG puderam ser detectados.

4 DISCUSSÃO

Macrolídeos possuem alta atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra micoplasmas de maneira geral (Gharaibeh & Al-Rashdan, 2011). Sabendo que o MG foi detectado como causador de doenças respiratórias em diversas espécies de aves, inclusive em frangos (Bradbury, 2001), deve-se encontrar uma maneira viável e rápida para diminuir os prejuízos causados por esse agente, especialmente reduzindo as condenações de carcaça por aerossaculite, em curto prazo. A tilosina base utilizada neste estudo nos grupos 3 e 4 mostrou-se muito

eficaz ($p < 0,01$) na redução das lesões macroscópicas causadas pelo MG como demonstrado na Figura 2. E a melhora das lesões macroscópicas com o uso da tilosina base nesses dois grupos ocorreu mesmo com as aves imunodeprimidas pelo CAV vacinal. Essa melhora pode estar relacionada à capacidade que os macrolídeos têm, mesmo em pequenas concentrações, de aumentar a atividade de macrófagos (Brumbaugh et al., 2002).

Apesar de lesões macroscópicas na traqueia não serem consideradas alvo de condenação de carcaça no abatedouro, pelo MG colonizar primariamente o trato respiratório superior, a recuperação macroscópica desse tecido (como demonstrado na Figura 1, onde $p < 0,01$), pode evitar que infecções secundárias se instalem, agravando o quadro clínico dessas aves. Os resultados obtidos nas análises macroscópicas do timo (Figura 3) mostraram que foi obtido o mesmo resultado que o artigo anterior.

Apesar de resistência à tilosina ser descrita em literatura, esses estudos mostram que essa resistência é desenvolvida mais vagarosamente quando comparado até mesmo a outros macrolídeos, como a eritromicina. Vale também considerar que a resistência à tilosina pode gerar uma resistência cruzada com a eritromicina, mas o contrário não é observado (Zanella et al., 1998; Wu et al., 2005).

As diversas tilosinas hoje presentes no mercado se apresentam tanto sob a forma de sal de tartarato que é hidrossolúvel, normalmente administrado via água de bebida, como sob a forma de sal de fosfato adicionado no alimento (López & Olvera, 2010) e também como tilosina base, que se preconiza aplicação intramuscular. Enquanto o sal de fosfato e o sal de tartarato apresentam limitações como baixa taxa de absorção e ação reduzida em comparação com outras bases farmacológicas (Lewicki, 2006), a tilosina base aplicada via intramuscular também apresenta-se como uma forma de difícil administração. Isso porque, por exemplo, em galpões comerciais onde o número de aves é muito alto, fica praticamente inviável o produtor aplicar o antibiótico em uma ave por vez, e mesmo em produções de subsistência essa administração fica limitada, não pelo número de aves, mas sim porque aplicações intramusculares em frangos ocorrem normalmente, na coxa ou no peito, considerados cortes nobres. Com a aplicação local, pode ocorrer lesão no tecido devido à reação inflamatória, levando a condenação desse corte. Além disso, fosfato e tartarato de tilosina apresentam-se no comércio em formulações para milhares de litros d'água ou toneladas de ração, dificultando o preparo de uma dose correta quando se visa o tratamento de um pequeno número de aves, o que é comum em criações de subsistência. Uma vez que as duas doses testadas neste estudo foram capazes de reduzir significativamente as lesões macroscópicas nas aves testadas, a dose a ser escolhida no tratamento deve ser aquela que melhor se adéque à situação e à viabilidade econômica. Logo, com este estudo sobre a administração de tilosina base via água de bebida foi capaz de verificar que essa forma de administração de uma tilosina base comercial pode ser eficaz quanto à redução

de lesões e seu comércio em pequenos frascos pode atender às necessidades de pequenos produtores rurais de aves de produção.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Ley, DH. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press; 2003. P.722-744.
- Yashpal, S. M., P. P. Devi, and M. G. Sagar. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:244–248. 2004.
- Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A. Micoplasmoses. In: Di Fabio, J, Rossini, L.I. *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 2009., p.485-496.
- LEWICKI, J. Tylosin: A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. 39p. 2006.
- Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I., Manso-Silvan, L., Lysnyansky, I. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. *Vet. Res.* 42, 90. 2011.
- Spinosa, HS. Macrolídeos. In: Spinosa HS, Gorniak, SL, Bernardi MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan. 2011.
- Yoder Jr. HW. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Calnek BW, Burnes HJ, Beard CW, Yoder Jr HW. *Diseases of poultry*. 9th ed. Ames: Iowa State University Press. 1991; p.198-212.
- Frey, M.L., R.P. Hanson and D.P. Anderson. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, 29: 2163-2171. 1968.
- LÓPEZ, H.S., OLVERA, L.G. Consideraciones farmacológicas de la antibioticoterapia en aves. *Farmacología Clínica en Aves Comerciales*. Sumano-Gutiérrez. 28p. 2010.
- Kogut MH, Tellez GI, McGruder ED, Hargis BM, Williams JD, Corrier DE, DeLoach JR. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. *Microb Pathog.* Feb;16(2):141-51. 1994.
- Boom, R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28(3):495. 1990.
- Marin, Sandra Y ; Barrios, P.R. ; Rios, RL ; Resende, M ; Resende, J.S. ; SANTOS, B. M. ; MARTINS, N. R. S. . Molecular characterization and epidemiology of chicken infectious anemia virus from subsistence and commercial chickens in Minas Gerais, Brazil. In: *World Poultry Congress 2012*, 2012, Salvador. *World Poultry Science Journal*. Salvador: World Poultry Congress, 2012. v. 1. p. 1-1.
- Gharaibeh, S., Al-Rashdan, M. Change in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* field isolates. *Vet. Microbiol.* 150, 379–383. 2011.

- Bradbury, J.M. Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. *Avian Pathol.* 30, 391–396. 2001.
- Brumbaugh GW, Herman JD, Clancy JS, Burden KI, Barry T, Simpson RB, López HS
Effect of tilmicosin on chemotactic, phagocytic, and bactericidal activities of bovine and porcine alveolar macrophages. *Am J Vet Res.* Jan;63(1):36-41. 2002
- Zanella, A., Dall'Ara, P., Lavazza, A., Marchi, R., Morena, M.A., Rampin, T., et al.
Interaction between Marek's disease virus and chicken infectious anemia virus. In K.A. Schat, R.M. Morgan, M.S. Parcells, & J.L. Spencer (Eds.), *Current Progress on Marek's Disease Research* (pp. 1119). Kennett Square, PA: American Association of Avian Pathologists. 2001.
- Wu CM, Wu H, Ning Y, Wang J, Du X, Shen J. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 247. 199-205. 2005.

- VERSÃO PRELIMINAR