

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MOLECULAR DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES DE PRODUÇÃO E  
ORNAMENTAIS**

**Renata Assis Casagrande**

**PORTO ALEGRE**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MOLECULAR DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES DE PRODUÇÃO E  
ORNAMENTAIS**

**Autora:** Renata Assis Casagrande

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientador:** Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Assis Casagrande, Renata  
Caracterização anatomopatológica, imuno-histoquímica  
e molecular de doenças infecciosas em aves de produção  
e ornamentais / Renata Assis Casagrande. -- 2013.  
84 f.

Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2013.

1. Mycoplasma gallisepticum. 2. Colibacilose. 3.  
Salmonella Gallinarum. 4. Chlamydia. 5. Toxoplasma  
gondii. I. Driemeier, David, orient. II. Título.

**RENATA ASSIS CASAGRANDE**

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MOLECULAR DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM AVES DE PRODUÇÃO E  
ORNAMENTAIS**

Aprovado em: 13/12/2013

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Aldo Gava  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Luciana Sonne  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini  
Membro da Comissão

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, meu socorro presente, em todos os momentos...

Aos meus pais, Veronis e Aldo, por todo amor, carinho e educação. O meu amor por vocês é imenso e eterno.

Ao Diego, com quem divido bons e maus momentos há 12 anos, sempre com companheirismo e amor, trilhando uma vida e construindo nossa família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. David Driemeier pela orientação, confiança, amizade e por ter possibilitado que eu realizasse este trabalho. Por sempre acreditar em nós, seus orientados, e achar que nossos sonhos são possíveis. Além de um grande professor e orientador, é um exemplo de dedicação, perseverança e humildade.

As minhas irmãs, Alexsandra e Sabrina...pela amizade, companheirismo, preocupação e amor. A minha sobrinha, Ana Flávia pelo amor e carinho incondicional. A Sahêdi e o Marcos, por todo amor de mãe e pai que me deram nestes anos de convivência. Ao tio Nereu e tia Rosa, minha família gaúcha, por todo amor e carinho. A todos os familiares que sempre torceram por mim e entenderam minha ausência.

Aos meus grandes amigos que jamais faltaram Angelica e Flademir. Muitos momentos foram meus pais, meus irmãos, meus amigos, meus colegas e até meus orientadores. Obrigada pelo carinho e cumplicidade de todos os momentos. Meu doutorado não seria o mesmo sem vocês.

Aos meus grandes amigos Veronica, Suyene, Fabi e Luiz. Nossa amizade será eterna... vocês são amigos para a vida toda. Obrigada por toda a amizade, companheirismo e por toda ajuda... Obrigada por toda a ajuda nos momentos mais difíceis...

Aos meus colegas de pós-graduação Tatiane, Gabriela, Lorena, Kivia, Gisele, Paula, Gabriel, Danilo, Gregory, Marcele, Daniele, Fabiana, Priscila, Caroline, Matheus e Neusa, por toda a amizade e companheirismo.

Aos professores do SPV Luciana, Cláudio e Saulo por todos os ensinamentos e ajuda de todos os momentos.

Ao Prof. Aldo Gava meu eterno orientador. Sem seus ensinamentos, dedicação e auxílio dado no início de minha vida acadêmica e durante os três anos que fui professora na UDESC, nada disto seria possível.

A prof<sup>ta</sup> Sandra Traverso, por todo o carinho e amizade. Sempre foi uma grande amiga e muito ajudou desde o primeiro momento que cheguei em Lages para ser profa. de patologia.

As técnicas e amigas Bárbara e Cintia, por sempre estarem dispostas a nos ajudar em todos os momentos. A todos os funcionários do SPV pelo carinho e amizade.

Aos pós-graduandos Andréia Spanamberg, Gustavo Machado e Priscila Guerra pela amizade e por toda a ajuda que foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese. A pós-doutoranda Luiza Castro por toda a ajuda e dedicação na realização das PCR de *Mycoplasma*.

Aos professores da pós-graduação Cláudio Canal, David Barcellos, Laerte Ferreira, Marisa Cardoso e Sérgio Ceroni por toda a ajuda e ensinamentos durante o doutorado.

Aos professores do IFC-Concórdia Ricardo, Débora, Eduardo, Joice, Wanderson, Lúcio, Diógenes, Felipe, Cláudio e Amanda por todo carinho e amizade. Ao Médico Veterinário Luis Carlos e aos estagiários da patologia do IFC, Marina, Carol, Ianara, Fran, Claiton, Neuber, Luan e Fernanda por toda a ajuda e amizade.

A Hilda Pena e Aline Cabral da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (USP) pela realização da genotipagem de *Toxoplasma*.

Ao médico veterinário Everton Fauth do Serviço de Inspeção Federal, por colaborar com as coletas no frigorífico de frangos de corte.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, que permitiu a execução deste estudo.

***A todos os animais existentes neste planeta,  
minha razão de viver e lutar por um mundo melhor.***

## RESUMO

As doenças infecciosas causam importantes perdas econômicas para a produção avícola e para a criação de aves domésticas de subsistência, exóticas e selvagens. No Brasil, há poucos estudos sobre as doenças infecciosas que acometem as aves, que correlacionem às lesões macroscópicas com o exame histopatológico e a identificação do agente presente nos órgãos lesionados. O objetivo desse estudo foi realizar essa tríade de diagnóstico em doenças infecciosas que acometem as aves de produção e ornamentais. O presente estudo resultou em cinco artigos. O primeiro artigo descreve dois surtos de micoplasmose em galinhas de subsistência utilizando a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) como método de diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum*. A técnica de IHQ apresentou boa concordância com os sinais clínicos, as lesões anatomopatológicas e os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O segundo artigo foi realizado em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose em um estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal. Em todas as aves condenados observou-se lesões macroscópicas e os órgãos mais acometidos foram fígado e sacos aéreos. Histologicamente, os diagnósticos mais frequentes foram hepatite necrosante aleatória, bronquite fibrino-heterofílica, pericardite aguda e traqueíte linfoplasmocitária. Desses casos isolou-se *E. coli*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. A PCR e a IHQ para *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* foram negativas. O terceiro artigo descreve um surto de tifo aviário em codornas japonesas, através do isolamento bacteriano, da caracterização anatomopatológica e da IHQ anti-*Salmonella*. O quarto artigo descreve, através de um estudo retrospectivo, as características anatomopatológicas de 12 casos de clamidiose em psitacídeos e padroniza a técnica de IHQ anti-*Chlamydia* como método de diagnóstico dessa enfermidade. O quinto artigo relata um caso sistêmico e fatal de toxoplasmose em uma perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*), descrevendo as lesões anatomopatológicas, a IHQ anti-*Toxoplasma gondii* e a genotipagem através da PCR. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico que correlacionem as lesões macro e microscópicas com a identificação do agente infeccioso são fundamentais para que as enfermidades nas aves sejam corretamente estudadas e diagnosticadas.

## ABSTRACT

Infectious diseases cause significant economic losses in poultry production and the breeding of domestic birds for subsistence and of exotic or wild birds. In Brazil, there have been few studies on the infectious diseases of birds in which macroscopic lesions have been correlated with histopathological examination and the identification of the agent present in the organs with lesions. The objective of this study was to apply this diagnostic triad to infectious diseases which affect poultry and ornamental birds. The study is reported in a series of five papers. The first paper describes two outbreaks of mycoplasmosis in subsistence farming chickens using the IHC technique as a diagnostic method for infection by *Mycoplasma gallisepticum*. The IHC technique showed good agreement with the clinical signs, the anatomopathological lesions and the results of the real-time PCR. The second paper describes a study carried out on broiler chickens which were totally condemned due to colibacillosis at an establishment under the control of the Federal Inspection Service. In all of the condemned birds macroscopic lesions were observed and the organs most affected were the liver and air sacs. Histologically, the most frequent diagnoses were random necrotizing hepatitis, fibrinous-heterophilic bronchitis, acute pericarditis and lymphoplasmocitary tracheitis. From these cases *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. and *Staphylococcus* sp. were isolated. The polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry (IHC) tests for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* were negative. The third paper describes an outbreak of fowl typhoid in Japanese quails, investigated by bacterial isolation, anatomopathological characterization and anti-*Salmonella* IHC. The fourth paper describes, through a retrospective study, the anatomopathological characteristics of 12 cases of chlamydiosis in psittacidae and standardizes the anti-*Chlamydia* IHC technique as a diagnostic method for this disease. The fifth paper reports a systemic and fatal case of toxoplasmosis in a Californian quail (*Callipepla californica*), describing the anatomopathological lesions, the anti-*Toxoplasma gondii* IHC and the genotyping through PCR. Thus, the development of diagnostic techniques which correlate the macro and microscopic lesions with the identification of the infectious agent are fundamental for diseases in birds to be properly studied and diagnosed.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	12
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1</b> "Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> em galinhas de subsistência".....	13
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2</b> "Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal".....	25
<b>5</b>	<b>ARTIGO 3</b> "Surto de tifo aviário ( <i>Salmonella Gallinarum</i> ) em codornas japonesas ( <i>Coturnix coturnix japonica</i> )".....	47
<b>6</b>	<b>ARTIGO 4</b> "Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos".....	60
<b>7</b>	<b>ARTIGO 5</b> "Toxoplasmose sistêmica fatal em perdiz-da-Califórnia ( <i>Callipepla californica</i> )".....	69
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, em virtude da evolução na cadeia produtiva avícola, algumas doenças foram controladas, entretanto, devido à intensificação de produção, o atual sistema de criação tem favorecido o surgimento de outras doenças que afetam o desempenho dos lotes. A intensificação da produção aumenta o risco de disseminação de doenças infecciosas de grande impacto econômico, especialmente as que afetam o sistema respiratório das aves. Essas enfermidades também causam grandes prejuízos à indústria avícola, já que acarretam condenações de carcaças ou de vísceras nas linhas de inspeção durante o abate de acordo com os critérios de julgamento estabelecido no Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (BRASIL, 1998).

A avaliação e o estudo de lesões encontradas durante o abate de aves em frigoríficos são reconhecidos como um método importante de monitoramento de enfermidades em criações comerciais (ANSONG-DANQUAH, 1987). As informações relacionadas ao desempenho zootécnico de cada lote e os dados referentes à condenação parcial ou total das carcaças são fundamentais para que se possam fazer correções no manejo e no programa sanitário.

No Brasil, há poucos estudos que correlacionem às lesões macroscópicas, de causa infecciosa, observadas em abatedouros de frango de corte com a caracterização histológica e a identificação do agente presente nos órgãos lesionados. Essa tríade de diagnóstico que contempla a caracterização macroscópica da lesão, o exame histopatológico e a identificação do agente são fundamentais para que se estimem o real impacto dos agentes infecciosos como causa de condenação de carcaças. Isso auxiliará na adoção de medidas preventivas e/ou curativas à campo, para que as perdas na indústria sejam minimizadas.

No sistema de produção avícola, os desafios sanitários vão além dos limites das granjas e dos aviários. As aves de produção podem coabitarem com aves domésticas de subsistência, aves exóticas e selvagens (ornamentais). A ausência de monitoria constante e de medidas de biosseguridade nos sistemas de produção de galinhas de subsistência e de outras espécies de aves de produção, bem como de aves exóticas e selvagens, pode representar uma ameaça a sanidade avícola industrial, uma vez que

esses animais servem como reservatório de patógenos, mantendo-os no meio ambiente (SAIF, 2008).

A criação de galinhas de subsistência, bem como de outras espécies de aves, pode representar uma importante fonte de renda para muitas propriedades rurais. No entanto, poucos estudos são realizados sobre as enfermidades que acometem essas aves. De acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) são realizadas apenas controles eventuais nos estabelecimentos avícolas produtores de ovos comerciais, de galinhas de subsistência, de exploração de outras espécies de aves e de criação de aves exóticas e selvagens (BRASIL, 1994).

Quanto as aves selvagens, o país possui o terceiro maior número de espécies do planeta. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) existem mais de 100 dessas espécies ameaçadas de extinção (CBRO, 2011). Essa perda da diversidade biológica é causada por diversos fatores, dentre eles a ocorrência de epizootias. Além da importância ecológica da conservação das aves, atualmente, várias espécies de aves exóticas e selvagens são criadas comercialmente, representando assim um novo nicho de mercado.

No Brasil, estudos de doenças em aves que contemplem a tríade de diagnóstico (1. lesões macroscópicas; 2. caracterização histopatológica e 3. identificação do agente) são recentes e escassos. A patologia aviária se desenvolveu separadamente da patologia de mamíferos domésticos e até poucas décadas, mesmo em países desenvolvidos, muitos diagnósticos de enfermidades infecciosas eram estabelecidos apenas pela realização de necropsia e isolamento do agente. Em nosso país, atualmente poucos laboratórios de patologia aviária utilizam a histopatologia como ferramenta de diagnóstico. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de doenças infecciosas que acometem as aves se fazem necessários.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar a tríade de diagnóstico: caracterização anatomopatológica (macroscopia e histopatologia) e identificação do agente presente nos órgãos lesionados através do cultivo microbiológico, da padronização e do desenvolvimento de técnicas de imunohistoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico de doenças infecciosas que acometem as aves de produção e ornamentais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Descrever dois surtos de micoplasmose em galinhas de subsistência utilizando a técnica de IHQ como método de diagnóstico da infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e correlacionar a mesma com os achados clínicos, anatomopatológicos e PCR;
- Realizar a caracterização das lesões anatomopatológicas e determinar o grau de concordância entre a condenação total por colibacilose com o diagnóstico anatomopatológico de frangos de corte abatidos, associando ao isolamento bacteriano dos órgãos com lesões, PCR e IHQ para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*;
- Descrever um surto de tifo aviário (*Salmonella Gallinarum*) em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), através do isolamento bacteriano, da caracterização anatomopatológica e de IHQ anti-*Salmonella*;
- Padronizar a técnica de IHQ como método de diagnóstico da clamidiose e descrever, através de um estudo retrospectivo, as características anatomopatológicas e de IHQ anti-*Chlamydia* de casos suspeitos de clamidiose em psitacídeos;
- Descrever um caso sistêmico e fatal de toxoplasmose em uma perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*), através da caracterização anatomopatológica, da IHQ anti-*Toxoplasma gondii* e da PCR.

### **3 ARTIGO 1**

Nesse item é apresentado o artigo "**Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas de subsistência**" submetido para publicação a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Trabalho.....

## Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas de subsistência<sup>1</sup>

Renata A. Casagrande<sup>2,3\*</sup>, Luiza A. Castro<sup>2</sup>, Veronica R. Machado<sup>2</sup>, Fladimir Wouters<sup>2</sup>, Fabiana M. Boabaid<sup>2</sup>, Suyene O. Souza<sup>2</sup>, Priscila R. Guerra<sup>2</sup>, Sérgio C. Silva<sup>2</sup> e David Driemeier<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Casagrande R.A., Castro L.A, Machado V.R., Wouters F., Boabaid F.M., Souza S.O., Guerra P.R., Silva S.C. & Driemeier D. 2013. **[Immunohistochemical diagnosis and pathological characterization of *Mycoplasma gallisepticum* in free-range chicken.]** Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas de subsistência. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: [casagrande\\_vet@yahoo.com.br](mailto:casagrande_vet@yahoo.com.br)

Avian mycoplasmosis is caused by bacteria from the *Mycoplasmataceae* family. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is the most pathogenic and economically significant species affecting poultry. The aim of this study was to use the immunohistochemistry technique (IHC) as a diagnostic method for the MG infection in poultry. In this report we described two outbreaks of mycoplasmosis caused by MG in free-range chickens. Clinical signs were characterized by prostration, decreased appetite, difficult breathing, runny nose and eyes. During necropsy were observed serous secretion in conjunctiva (7/10) and sinuses (4/10), edema and caseous exudate; air sacs thickened with foam and caseous exudate (6/10); trachea diffusely reddish (4/10); lungs with 0.5 cm whitish spots (2/10); and pericardial sac with fibrin exudate (2/10). Histologically was observed a lymphoplasmacytic hyperplastic acute tracheitis (10/10), sinusitis (5/5) and conjunctivitis (3/4); fibrinonecrotic bronchopneumonia (5/10); acute fibrinous pericarditis (2/10); and fibrinonecrotic aerosaculitis (1/1). IHC anti-MG stained in the extracellular surface of ciliated brush border and/or in the top of epithelium of trachea (10/10), bronchi (5/10) and sinuses (4/5). In seven out of ten cases it was possible to detect MG by real-time PCR from tracheal swabs. IHC anti-MG used as a diagnostic method showed good correlation with clinical signs, lesions and real-time PCR results.

**INDEX TERMS:** Respiratory disease, birds, mycoplasmosis, *Mollicutes*.

**RESUMO.-** A micoplasmose aviária é causada por bactérias da família *Mycoplasmataceae*. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é a espécie mais patogênica e que tem a maior importância econômica para a produção avícola. Este estudo teve por objetivo utilizar a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) como método de diagnóstico da infecção por MG em aves. No presente relato são descritos dois surtos de micoplasmose por MG em galinhas de subsistência. Clinicamente as aves apresentaram prostração, hiporexia, dificuldade respiratória, secreção nasal e ocular. Na necropsia foram observados secreção serosa, edema e deposição de cáseo em conjuntiva (7/10) e sinus nasais (4/10), sacos aéreos espessados com espuma e cáseo (6/10); traqueia difusamente avermelhada (4/10); pulmões com pontos esbranquiçados de 0,5cm (2/10); e saco pericárdico com deposição de fibrina (2/10). No exame histopatológico foram evidenciados traqueíte (10/10),

<sup>1</sup> Recebido em 19 de novembro de 2013.

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

\*Autor para correspondência: [casagrande\\_vet@yahoo.com.br](mailto:casagrande_vet@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Instituto Federal Catarinense, SC-283, Km 8, Vila Fragosos, Concórdia, SC 89700-000, Brasil.

sinusite (5/5) e conjuntivite (3/4) hiperplásica linfoplasmocitária aguda; broncopneumonia fibrinonecrótica (5/10); pericardite fibrinosa aguda (2/10); e aerossaculite fibrinonecrótica (1/1). No exame de IHQ anti-MG foi evidenciada marcação na superfície extracelular dos cílios e/ou topo do epitélio da traqueia (10/10), brônquios (5/10) e sinus nasais (4/5). Em sete dos dez casos analisados foi detectada a presença de MG por PCR em tempo real realizado a partir de amostras de suabe traqueal. A técnica de IHQ anti-MG utilizada como método de diagnóstico apresentou boa concordância com os sinais clínicos, as lesões histopatológicas e os resultados de PCR em tempo real.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Doença respiratória, aves, micoplasmose, *Mollicutes*.

## INTRODUÇÃO

A micoplasmose aviária é causada por bactérias da família *Mycoplasmataceae* e mais de 25 espécies foram isoladas em aves. *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) e *M. iowae* (MI) são consideradas as espécies mais importantes para galinhas e perus, sendo que MG é o mais patogênico (Kleven 2008).

Em galinhas, MG causa a Doença Respiratória Crônica (DRC), caracterizada por tosse, espirros, secreção nasal, sinusite, diminuição do consumo de alimento, diminuição no ganho de peso e na produção de ovos. O curso clínico da doença geralmente é longo e os sinais clínicos, muitas vezes, podem ser brandos (Ley 2008). No entanto, casos com alta morbidade e mortalidade, geralmente foram associados a fatores ambientais e a infecções por *Escherichia coli*, pelo vírus da bronquite infecciosa e da doença de Newcastle. Nesses casos, observa-se principalmente aerossaculite severa e também pneumonia, pericardite e peri-hepatite (Gross 1961, Fabricant & Levine 1962, Gross 1990, Minharro et al. 2001).

As micoplasmoses estão entre as principais doenças aviárias e fazem parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com vigilância oficial na avicultura comercial. Os estabelecimentos avícolas de linhagens puras, bisavós e avós de galinhas devem ser livres de MG e MS. Já as matrizes devem ser livres de MG e sob vigilância e acompanhamento para MS. De acordo com o PNSA, em estabelecimentos avícolas produtores de ovos comerciais, de frango de corte, de galinhas de subsistência (fundo-de-quintal), de exploração de aves silvestres, ornamentais e exóticas, bem como em incubatórios desses estabelecimentos, devem ser realizados controles eventuais, sem regra de monitoria estabelecida (Brasil 2001).

A ausência de monitoria constante em sistemas de produção de aves com ciclo de vida curto como os frangos de corte, bem como poedeiras, aves de criação extensivas, selvagens e ornamentais, representa uma ameaça à sanidade avícola industrial, uma vez que esses animais podem servir como reservatório de micoplasmas, mantendo-os no meio ambiente (Cookson & Shivaprasad 1994, Nunoya et al. 1995, Nunoya et al. 1997, Minharro et al. 2001, Buim et al. 2009, Gomes et al. 2010, Machado et al. 2012).

Atualmente, o diagnóstico definitivo de micoplasmose é realizado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma vez que as espécies de *Mycoplasma* são de difícil isolamento (Callison et al. 2006, Buim et al. 2009, Jarquin et al. 2009, Raviv & Kleven 2009). Os exames sorológicos de soroaglutinação em placa (SAR) e o teste imunoenzimático (ELISA) também são frequentemente utilizados no diagnóstico (Ley 2008, Kleven & Ferguson-Noel 2008). No entanto, muitas vezes, através de um exame sorológico ou de PCR não é possível diferenciar os animais portadores daqueles doentes. Os resultados dos exames sorológicos também podem ser inconsistentes, pois os anticorpos só são detectados depois de uma a três semanas após a infecção (Kleven 1975).

Para que o diagnóstico de micoplasmose seja efetivo, é necessário associar os dados do quadro clínico, das lesões macroscópicas e histopatológicas com a identificação do agente. A utilização da imuno-histoquímica (IHQ) permite verificar se o agente identificado está presente na lesão e esse é considerado um importante teste de diagnóstico *post mortem* (Nunoya et al. 1995, Nunoya et al. 1997, Radi et al. 2000, Yilmaz et al. 2011, Yilmaz & Timurkaan 2011).

O objetivo desse estudo foi descrever dois surtos de micoplasmose em galinhas de subsistência utilizando a técnica de IHQ como método de diagnóstico da infecção por MG e correlacionado a mesma com os achados clínicos, anatomopatológicos e PCR em tempo real.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção das amostras

Durante o período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012 acompanhou-se 10 casos de doença respiratória compatível com micoplasmose em galinhas de subsistência enviadas ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Durante esse período, buscou-se o mesmo número de aves sem histórico de doença respiratória para serem utilizadas como controles negativos. Realizou-se a busca dos blocos de parafina e, posteriormente, os cortes e coloração pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para caracterização histológica das lesões. Dessas aves buscaram-se também fragmentos de traqueia congelados.

### Exame microbiológico

Suabes de sinus nasais (casos 1, 7 e 8), suabe de saco aéreo e saco pericárdico, bem como fragmento de pulmão (caso 1) foram coletados assepticamente e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS. Esses foram submetidos ao cultivo bacteriano aeróbio em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar MacConkey. As amostras foram incubadas a 37 °C, durante 24-72 horas. Após, realizou-se a identificação bacteriana através da observação macroscópica das colônias, da morfologia microscópica e do perfil bioquímico dos isolados. Os testes bioquímicos empregados foram a detecção das enzimas catalase, verificação da presença de citocromo oxidase, fermentação de carboidratos, produção de urease, hidrólise de gelatina, utilização de citrato e degradação de aminoácidos.

### Imuno-histoquímica para *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*

Fragmentos em blocos de parafina de traqueia (10/10), pulmões (10/10), sinus nasais (5/10), conjuntiva (4/10) e sacos aéreos (1/10) dos casos e fragmentos de traqueia (10/10), pulmões (10/10), sacos aéreos (3/10) e sinus nasais (1/10) dos controle negativos foram submetidos à IHQ anti-MG e anti-MS conforme descrito por Yilmaz et al. (2011) e Yilmaz & Timurkaan (2011).

As amostras foram submetidas à IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos numa solução a 10% de peróxido de hidrogênio em metanol durante 10 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato pH 6,0 por quatro ciclos de cinco minutos cada em micro-ondas com potência de 750 W. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com *Protein block* (DakoCytomation®) por 7 minutos, à temperatura ambiente. Utilizaram-se os anticorpos primários anti-*Mycoplasma gallisepticum* e anti-*M. synoviae* policlonais produzidos em coelhos (Weybridge Lab.) na diluição 1:800 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas a 37 °C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation®) 20 minutos cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469, DakoCytomation®). Para contracenar foi utilizada a hematoxilina de Mayer seguida de montagem em meio aquoso (S1964, DakoCytomation). Como controle positivo foi utilizado um corte histológico de traqueia com lesões histopatológica compatíveis com micoplasmose e PCR positivo para MG, enquanto que para MS utilizou-se corte histológico de traqueia de uma galinha inoculado com o isolado k1968. Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por PBS. Para excluir a possibilidade de reação cruzada do anticorpo com as diferentes espécies de *Mycoplasma*, o controle positivo de MG foi incubado com o anticorpo anti-MS, o controle positivo de MS foi incubado com anti-MG e um controle positivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* foi incubado com ambos anticorpos. Para as diferentes intensidades de marcação foram atribuídos os graus de (-) ausência de marcação, (+) intensidade discreta, (++) intensidade moderada e (+++) intensidade acentuada.

### Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* por PCR em tempo real

A detecção de MG e MS por PCR em tempo real foi feita a partir de suabes de traqueia dos casos identificados e dos controle negativos. Em quatro casos, onde não havia a disponibilidade de suabes de traqueia congelados foram usados fragmentos de traqueia em bloco de parafina.

O DNA total foi extraído e purificado de suabes de traqueia utilizando o kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen®) e o DNA de amostras emblocadas em parafina (FFPE) com o kit comercial *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliar a qualidade do DNA extraído e a presença de possíveis inibidores na reação, foram

adicionados 2 µL/amostra de Xeno (controle interno positivo) no tampão de lise antes da extração. Os DNAs foram recuperados em um volume de eluição de 100 µL para as amostras de suabes e 50 µL para as amostras FFPE. Foram utilizados 5 µL de DNA em cada reação.

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando as sondas *Taqman*<sup>®</sup> e oligonucleotídeos do kit comercial MG/MS *Custom assay* (Life Technologies<sup>®</sup>) e enzimas, dNTPs, ROX, tampões e controle interno positivo (Xeno controle) contidos no *kit VetMAX-Plus qPCR Master Mix* (Life Technologies<sup>®</sup>). PCR em tempo real foi feito no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Os ciclos de amplificação foram aqueles sugeridos pelo fabricante, a saber: 95 °C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos.

Como controles positivos foram utilizadas as bacterinas comerciais Myco-Galli MG-70 (Biovet<sup>®</sup>) para *M. gallisepticum* e Mycovax MS-H (Merial<sup>®</sup>) para *M. synoviae*. O conteúdo liofilizado de um frasco de cada bacterina contendo 1.000 doses (aproximadamente 10<sup>7</sup> CCU/dose) foi ressuspenso em 30 mL de PBS, e uma alíquota de 500 µL foi aquecida a 95 °C por 10 minutos, centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm, e 1 µL do sobrenadante foi utilizado diretamente na reação. Para a quantificação do número de CCU (*color-changing units*) em cada amostra, foi realizada uma curva padrão de cada controle positivo nas seguintes diluições: 1:1, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:10.000. Foram adicionados 2 µL do controle Xeno diretamente nas reações controle positivas. As amostras apresentando Ct (ciclo *threshold*) menor que 40 foram consideradas positivas.

## RESULTADOS

O primeiro surto de micoplasmose ocorreu em abril de 2011 em uma propriedade rural do município de Porto Alegre, RS. O produtor havia iniciado a criação de aves para postura a menos de um ano e tinha adquirido 100 pintos de 21 dias, aparentemente saudáveis. Após dois meses, comprou mais seis galinhas com aproximadamente quatro meses de idade. Quinze dias após a aquisição dessas seis aves, as mesmas apresentaram prostração, diminuição no consumo de alimento, dificuldade respiratória, secreção nasal e ocular (Fig.1). Em poucos dias os 100 pintos começaram com os mesmos sinais clínicos e no período de 10 dias, 15 morreram. Além desses animais, havia mais 40 galinhas adultas que não apresentaram problemas. O produtor encaminhou uma ave morta e três vivas para necropsia (casos 1 a 4).

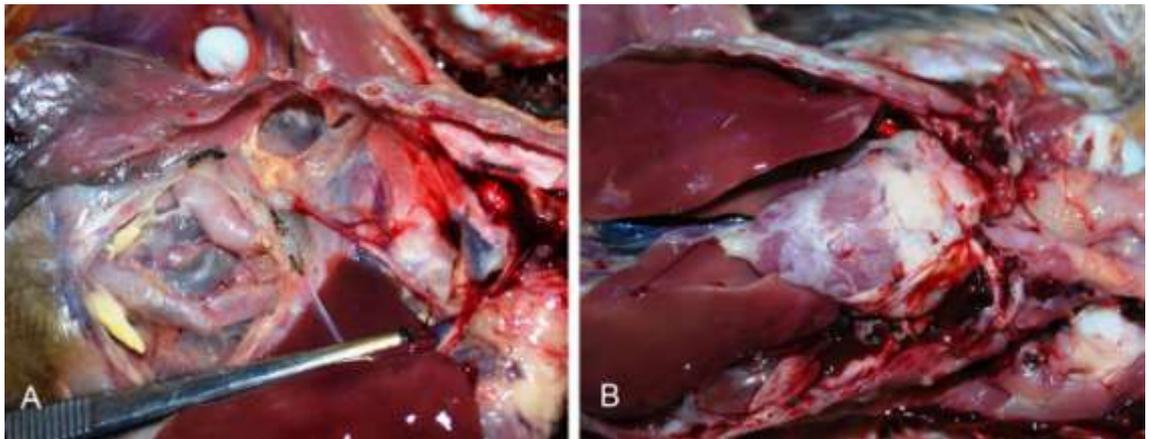
O segundo surto ocorreu em fevereiro de 2012 no município de Pantano Grande, RS. Essa propriedade tinha um plantel de 60 galinhas para postura de ovos e rotineiramente era realizada a compra de novos animais. Nesse período houve o nascimento de pintos clinicamente saudáveis até os 30 dias de vida, depois apresentavam prostração, diminuição de consumo de alimento, definhamento e morte. Ao todo morreram 20 pintos. Em visita a propriedade foi observado que muitas aves, com até três meses de idade, também apresentavam dificuldade respiratória, secreção nasal e ocular. Seis aves foram enviadas para necropsia (casos 5 a 10).

As características das aves acometidas por micoplasmose e dos controles negativos são apresentadas no Quadro 1. Em 10 aves com micoplasmose, nove apresentavam menos de três meses de idade, todas com sinais respiratórios. Entretanto, em quatro estes sinais eram brandos e caracterizados por prostração e leve dificuldade respiratória. As aves utilizadas como controles (11 a 20) não apresentavam quadro clínico respiratório nem lesões compatíveis com micoplasmose e foram utilizadas para avaliar a especificidade do exame de IHQ para MG e MS.

A caracterização das lesões anatomopatológicas e o resultado de IHQ dos casos de micoplasmose são apresentados no Quadro 2. Macroscopicamente, foi observado na conjuntiva secreção serosa e edema com deposição de cáseo (7/10) (Fig.1); nos sinus nasais secreção serosa com deposição de cáseo (4/10) (Fig.1); nos sacos aéreos espessamento, espuma e cáseo (6/10) (Fig.2A); na traqueia mucosa difusamente avermelhada (4/10); e nos pulmões pontos esbranquiçados de 0,5 cm de diâmetro (2/10). Além das lesões no sistema respiratório, foi observado, também, espessamento do saco pericárdico com deposição de fibrina (2/10) (Fig.2B). Em duas aves não foram observadas lesões macroscópicas.



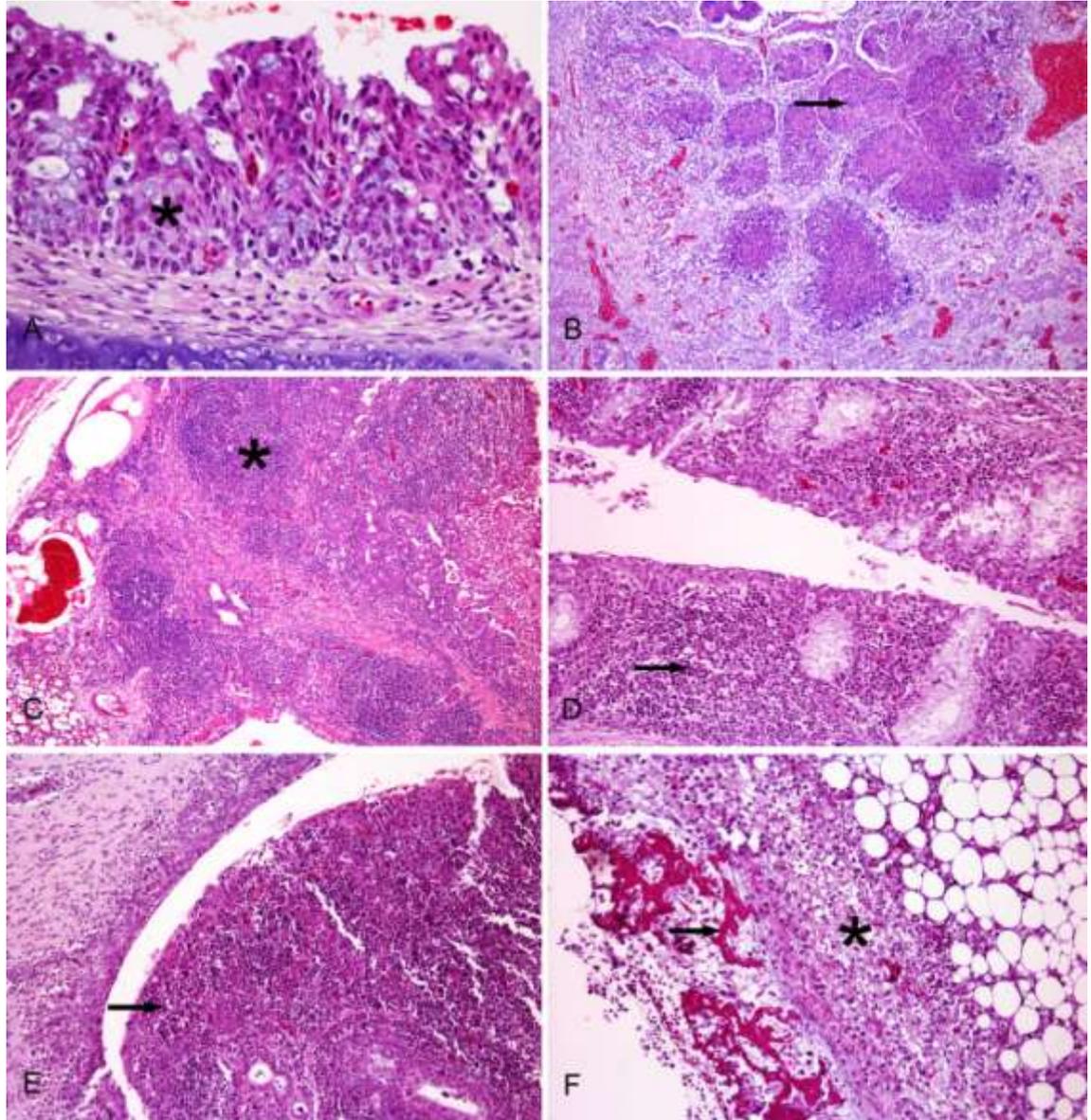
**Fig.1.** Infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas. Ave com dificuldade respiratória caracterizada por respiração com bico aberto associado a edema de conjuntiva, secreção serosa ocular e nasal.



**Fig.2.** Infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas. Lesões macroscópicas: **(A)** sacos aéreos espessados e com deposição de cáseo. **(B)** coração com deposição de fibrina no epicárdio.

No exame histopatológico, todos os casos de micoplasmose apresentaram lesões no sistema respiratório, sendo que em nove aves foram observadas lesões em mais de um órgão desse sistema. As lesões foram observadas em traqueia (10/10), sinus nasais (5/5), conjuntiva (3/4), sacos aéreos (1/1), pulmões (5/10) e coração (2/10). Na traqueia foi evidenciado espessamento da mucosa devido à hiperplasia do epitélio difusa acentuada com ausência de cílios, hiperplasia de glândulas mucosas e infiltrado linfoplasmocitário discreto (10/10) (Fig.3A). Em cinco aves foram observadas lesões pulmonares, caracterizadas por broncopneumonia fibrinonecrótica multifocal acentuada circundada por infiltrado de heterófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas (5/10) com colônias bacterianas intralesionais (4/5) (Fig.3B). Nesses casos, ainda foi evidenciada hiperplasia do tecido linfóide peribronquial (BALT) moderada (2/5) a acentuada (1/5) formando nódulos linfóides subepiteliais (Fig.3C), hiperplasia epitelial da mucosa bronquial (3/5) e de glândulas mucosas (2/5). Nos sinus nasais foi evidenciada hiperplasia do epitélio e das glândulas mucosas difusa acentuada associada a infiltrado inflamatório predominante de linfócitos e plasmócitos com formação de nódulos linfóides subepiteliais difuso acentuado (Fig.3D). Havia ainda moderada quantidade de muco e debris celulares no lúmen dos sinus nasais (5/5). Na conjuntiva foi observada hiperplasia do epitélio difusa acentuada associada a infiltrado

inflamatório predominante de linfócitos e plasmócitos com formação de nódulos linfóides subepiteliais difuso acentuado (Fig.3E) (3/4). Evidenciou-se, ainda, nos sacos aéreos, infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos associado à deposição de fibrina e debris celulares multifocal moderado (1/1). Em dois casos havia pericardite aguda caracterizada por exsudação de fibrina acompanhada por infiltrado de heterófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos difuso acentuado (Fig.3F). Dos três casos em que foram realizadas culturas bacterianas, foram isolados *Micrococcus* sp., a partir de suabe dos sinus nasais e dos pulmões (caso 1) e *Escherichia coli*, a partir de suabe de sinus nasais (casos 7 e 8).



**Fig.3.** Infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas. **(A)** Traqueia com hiperplasia do epitélio da mucosa difusa acentuada (asterisco). HE, obj.40. **(B)** Pulmões com broncopneumonia fibrinonecrotica e colônias bacterianas intralésionais (seta). HE, obj.10. **(C)** Pulmões com hiperplasia do tecido linfoide peribronquial (BALT) acentuada (asterisco). HE, obj.10. **(D)** Sinus nasais com infiltrado linfoplasmocitário difuso moderado na mucosa (seta). HE, obj.20. **(E)** Conjuntiva com infiltrado linfoplasmocitário difuso moderado (seta). HE, obj.20. **(F)** Coração com pericardite aguda caracterizada por exsudação de fibrina (seta) acompanhada por infiltrado de heterófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos (asterisco). HE, obj.20.

**Quadro 1. Características das galinhas de subsistência com micoplasmose e dos controles negativos**

Caso	Idade	Diagnóstico	Quadro clínico respiratório	Lesão em sistema respiratório		IHQ MG	PCR MG (CCU)	IHQ MS	PCR MS (CCU)
				Macrosc.	Histol.				
1	80 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	-*	-	-
2	80 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	9,2x10 <sup>3</sup> *	-	-
3	80 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	1,6x10 <sup>6</sup>	-	-
4	80 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	9,6x10 <sup>1</sup>	-	-
5	40 dias	Micoplasmose	+	-	+	+	-*	-	-
6	40 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	-*	-	-
7	30 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	1,3x10 <sup>2</sup>	-	-
8	30 dias	Micoplasmose	+	+	+	+	3,1x10 <sup>3</sup>	-	-
9	30 dias	Micoplasmose	+	-	+	+	3,6x10 <sup>3</sup>	-	-
10	1 ano	Micoplasmose	+	+	+	+	2,7x10 <sup>3</sup>	-	-
11	1 ano	Pasteurelose	-	+	-	-	-	-	8,7x10 <sup>2</sup>
12	1 ano	Pasteurelose	-	+	-	-	-	-	-
13	1 ano	Pasteurelose	-	+	-	-	1,2x10 <sup>1</sup>	-	5,2x10 <sup>2</sup>
14	6 meses	Botulismo	-	-	-	-	9,3	-	1,1x10 <sup>3</sup>
15	1 ano	Botulismo	-	-	+	-	-	-	-
16	1 ano	Botulismo	-	-	+	-	-	-	-
17	4 meses	Septicemia	-	-	+	-	-	-	-
18	NI	Leucose	-	-	-	-	4,7x10 <sup>1</sup>	-	1,4x10 <sup>3</sup>
19	1,5 anos	Colibacilose	NI	-	-	-	-	-	-
20	1,5 anos	Colibacilose	NI	-	-	-	-	-	-

IHQ = imuno-histoquímica; PCR = reação de polimerase em cadeia; CCU = *color-changing unit*; PCR + = CT < 40; MG = *Mycoplasma gallisepticum*; MS = *Mycoplasma synoviae*; NI = dado não informado; \*PCR de amostras emblocadas em parafina; + = presente ou positivo; - = ausente ou negativo; casos 1 a 4 = primeiro surto; casos 5 ao 10 = segundo surto.

No exame de IHQ anti-MG pode ser detectada marcação na superfície extracelular dos cílios e/ou topo do epitélio da traqueia (10/10) (Fig.4A-B), dos cílios do epitélio bronquial dos pulmões (5/10) (Fig.4C) e no topo do epitélio e no exsudato luminal dos sinus nasais (4/5) (Fig.4D). Não houve marcação na conjuntiva e nos sacos aéreos dos casos testados. Na IHQ anti-MS todas as amostras foram negativas. Através da IHQ foi observada ausência de reação cruzada entre as diferentes espécies de *Mycoplasma*. O controle positivo de MG apresentou resultado negativo para MS, o controle positivo de MS apresentou resultado negativo para MG e o controle positivo de *M. hyopneumoniae* apresentou resultado negativo com ambos os anticorpos.

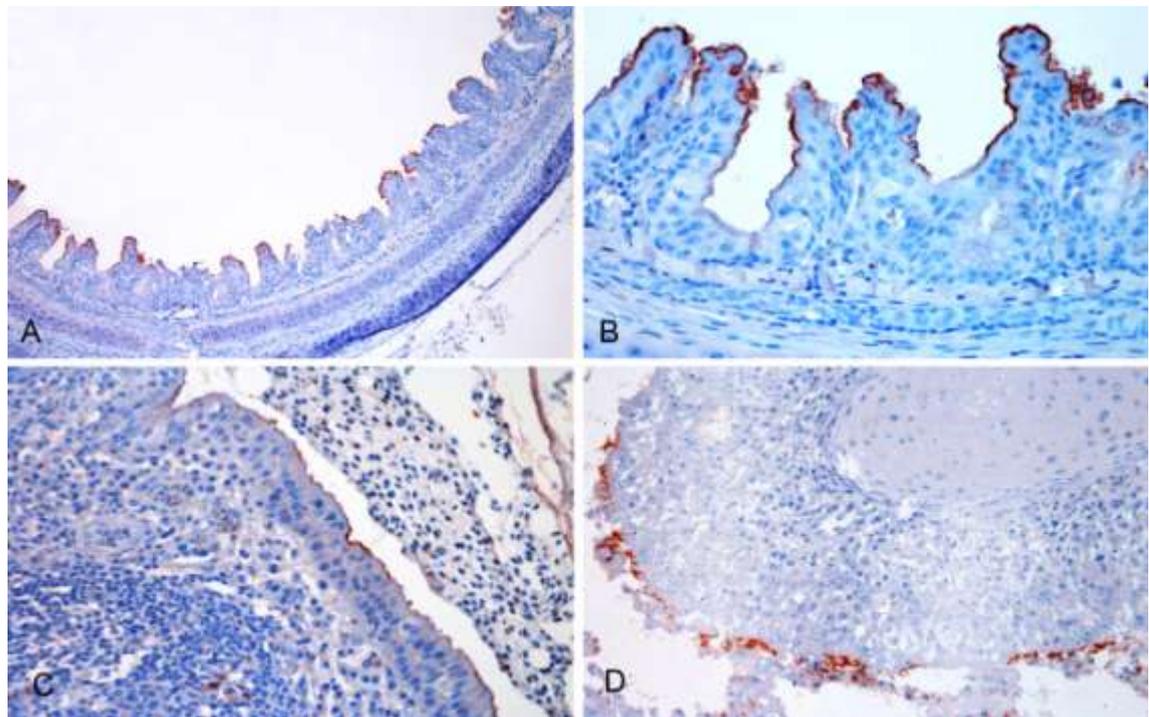
Através da utilização de PCR em tempo real foi possível detectar MG em amostras de sete dos casos; não foi possível detectar MS em quaisquer das dez amostras (Quadro 1). As três aves onde não foi possível a detecção de MG correspondiam a amostras emblocadas em parafina, devido à indisponibilidade de material congelado.

Nos controles negativos foram observados à necropsia sacos aéreos abdominais opacos e com pequena deposição de espuma (3/10). No exame histopatológico havia aerossaculite heterofílica multifocal discreta (1/10), pneumonia granulomatosa focal discreta (1/10) e pneumonia fibrino-heterofílica focal discreta (1/10). Em nenhum desses controles negativos houve marcação na IHQ para MG e MS. Nestes mesmos controles, foi identificado MG em três aves e MS em quatro aves, através de PCR em tempo real.

**Quadro 2. Caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica dos casos de micoplasmose em galinhas de subsistência**

Órgãos	Lesões macroscópicas (nº casos)	Lesões histopatológicas (nº casos)	IHQ anti-MG (nº casos)
<b>Conjuntiva</b>	Secreção serosa (5/10) Edemaciada e cáseo (2/10)	Conjuntivite hiperplásica linfoplasmocitária aguda difusa moderada (3/4)	- (4/4)
<b>Sinus nasais</b>	Secreção serosa (2/10) Deposição de cáseo (2/10)	Sinusite hiperplásica linfoplasmocitária aguda difusa moderada (5/5)	- (1/5) ++ (3/5) +++ (1/5) + (7/10)
<b>Traqueia</b>	Difusamente avermelhada (4/10)	Traqueíte hiperplásica linfoplasmocitária aguda difusa (10/10)	++ (1/10) +++ (2/10)
<b>Pulmões</b>	Pontos esbranquiçados de 0,5 cm (2/10)	Broncopneumonia fibrinonecrótica multifocal acentuada (5/10) Hiperplasia epitelial difusa acentuada da mucosa de brônquios (3/10) Hiperplasia linfoide peribronquial acentuada (1/10) e moderada (2/10)	- (5/10) + (4/10) ++ (1/10)
<b>Sacos aéreos</b>	Deposição de espuma e cáseo (6/10)	Aerossaculite fibrinonecrótica difusa moderada (1/1)	- (1/1)
<b>Coração</b>	Deposição de fibrina no epicárdio (2/10)	Pericardite fibrinosa aguda difusa acentuada (2/10)	NR

IHQ = imuno-histoquímica; intensidade de marcação: - = negativa; + = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; NR = não realizado.



**Fig.4.** Imuno-histoquímica anti-*Mycoplasma gallisepticum*. **(A)** Traqueia com marcação nos cílios e/ou topo do epitélio. Obj.10. **(B)** Maior aumento do A. Obj.40. **(C)** Pulmões com marcação nos cílios do epitélio bronquial. Obj.40. **(D)** Sinus nasais com marcação no topo do epitélio e no exsudato luminal. Obj.40. Estreptavidina-biotina ligada à peroxidase.

## DISCUSSÃO

No presente relato foram descritos dois surtos de infecção por *Mycoplasma gallisepticum* em galinhas de fundo de quintal utilizadas para a produção de ovos. Essa espécie de *Mycoplasma* é a mais patogênica e que tem a maior importância econômica para a produção avícola (Ley 2008). No Brasil, 250 surtos de micoplasmose por MG foram notificados nos últimos 5 anos (2008-2012) (OIE 2013). Entretanto, é possível que o número de casos seja maior, pois muitos não são relatados.

O quadro clínico-patológico observado nesses dois surtos foi semelhante a outros relatos de infecção experimental e espontânea por MG em galiformes (Cookson & Shivaprasad 1994, Nunoya et al. 1995, Radi et al. 2000, Ley 2008, Vitula et al. 2011, Yilmaz et al. 2011). A lesão causada por MG ocorre especialmente nos sinus nasais, traqueia e sacos aéreos, embora os pulmões também possam estar envolvidos (Fletcher et al. 2008). Hiperplasia do epitélio respiratório associado à inflamação linfocitária com formação de agregados linfóides, principalmente hiperplasia de BALT são sugestivos de infecção por MG (Cookson & Shivaprasad 1994, Nunoya et al. 1995, Radi et al. 2000, Fletcher et al. 2008, Ley 2008, Vitula et al. 2011, Yilmaz et al. 2011).

A técnica de imuno-histoquímica anti-MG utilizada como método de diagnóstico apresentou boa concordância com os sinais clínicos, as lesões histopatológicas e os resultados da PCR em tempo real. Todos os casos que apresentaram sinais clínicos respiratórios e lesões anatomopatológicas compatíveis com micoplasmose foram positivos na IHQ anti-MG e nenhum foi positivo para MS. Esse anticorpo demonstrou ser bastante específico, pois não houve reação cruzada com o anticorpo anti-MS e também para *Mycoplasma* de suíno (*M. hyopneumoniae*). Utilizando os mesmos anticorpos policlonais anti-MG e anti-MS do presente estudo, Yilmaz et al. (2011) encontraram seis animais simultaneamente positivos para MG e MS, no entanto os autores atribuíram a uma dupla infecção e não a uma reação cruzada. Anticorpos policlonais anti-MG e anti-MS podem exibir reações cruzadas entre si, pois essas duas espécies apresentam determinantes antigênicos em comum (Bradley et al. 1988, Radi et al. 2000).

Yilmaz et al. (2011) compararam IHQ, PCR e cultura bacteriana como método de diagnóstico de micoplasmose em frangos de corte e encontraram concordância de 96,3% para MG e 95,7% para MS entre essas três técnicas. Em mamíferos existem muitos estudos utilizando IHQ para detecção da infecção por micoplasma (Almeida et al. 2012), no entanto em aves o número de trabalhos é limitado (Nunoya et al. 1995, Nunoya et al. 1997, Radi et al. 2000, Yilmaz et al. 2011, Yilmaz & Timurkaan 2011).

Nesse estudo foi observado que a imunomarcagem anti-MG ocorreu principalmente na traqueia e nos sinus nasais seguido pelos pulmões (5/10). Não foi possível a avaliação dos sacos aéreos, pois foram colhidos de apenas uma ave. Em um estudo de MG em frangos de corte, a marcação também ocorreu principalmente em traqueia, pulmões e sinus nasais (Yilmaz et al. 2011). Em infecção experimental por MG em perus a marcação foi significativamente mais intensa no epitélio dos sinus nasais que no da traqueia e dos pulmões (Radi et al. 2000). Nos quatro casos em que se realizou IHQ de conjuntiva não foi observado marcação, no entanto, em um surto de ceratoconjuntivite em galinhas poedeiras a imunomarcagem ocorreu no epitélio da conjuntiva e córnea (Nunoya et al. 1995).

*Mycoplasma gallisepticum* é uma bactéria extracelular e infecta a superfície do epitélio respiratório e da conjuntiva das aves (Nunoya et al. 1995, Ley 2008). Amostras patogênicas têm capacidade de adesão e invasão celular, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos levando a uma doença sistêmica (Ley 2008). Portanto, a marcação para MG na IHQ ocorreu na superfície extracelular do topo do epitélio traqueal, bronquial e sinusal, da mesma forma que foi evidenciada em outros estudos (Nunoya et al. 1995, Nunoya et al. 1997, Radi et al. 2000, Yilmaz et al. 2011, Yilmaz & Timurkaan 2011). Esse tipo de marcação em superfície epitelial pode dificultar a interpretação do resultado, pois pode ser confundido com precipitação de cromógenos em bordos de tecidos e em desprendimento celular devido a artefatos de processamento. Portanto, essa foi a maior dificuldade encontrada na utilização dessa técnica, principalmente quando o tecido avaliado apresenta pouca imunomarcagem.

A concordância da IHQ anti-MG e anti-MS e da PCR em tempo real para MG e MS de amostras de traqueia congeladas foi de 100%. No entanto, em quatro casos só havia fragmentos de traqueia fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP) para a realização de PCR e desses, apenas um caso foi positivo para MG. A PCR para detecção de *Mycoplasma* pode ser realizada a partir de amostras de tecidos refrigerados ou congelados, ou ainda de tecidos FFEP. Entretanto, o processo de fixação em formalina pode inibir a amplificação de DNA. Em um estudo sobre diagnóstico de infecção por *M. hyopneumoniae* em suínos, associando o exame histopatológico, IHQ

e PCR, observou-se que a positividade da PCR de tecidos FFEP diminuiu em comparação com as mesmas amostras refrigeradas ou congeladas (Almeida et al. 2012).

Com intuito de avaliar a especificidade do anticorpo, foram incluídas nesse estudo 10 aves que não apresentavam quadro clínico e/ou lesões compatíveis com micoplasmose e, em todos os casos a IHQ anti-MG e anti-MS foram negativas. Desses casos, a detecção por PCR em tempo real foi possível em três deles para MG e em quatro para MS. Devido a ausência de sinais clínicos e/ou lesões características é sugerido que essas aves fossem apenas portadoras. Apesar da alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR na detecção de micoplasmas, a mesma não permite diferenciar aves portadoras daquelas doentes (Jarquin et al. 2009).

No presente relato foram observadas infecções bacterianas secundárias à micoplasmose. Os agentes associados foram *E. coli* e *Micrococcus* sp isolados de sinus nasais e pulmões. Bactérias como *E. coli*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus xylosum* (Gross 1961, Fabricant & Levine 1962, Gross 1990, Cookson & Shivaprasad 1994, Vitula et al. 2011), bem como o vírus da bronquite infecciosa e da doença de Newcastle (Gross 1961, Fabricant & Levine 1962, Gross 1990) já foram isoladas em infecções respiratórias sinérgicas com MG, levando a um agravamento do quadro clínico e da mortalidade. No epitélio respiratório, MG causa cilioestase, destruição e esfoliação das células epiteliais ciliadas e não-ciliadas propiciando infecções secundárias. Agentes imunossupressores, estressantes ou condições ambientais desfavoráveis, muitas vezes, são responsáveis por infecções respiratórias graves por MG (Ley 2008).

É possível que, nos dois surtos relatados no presente trabalho, a aquisição de novas aves pouco tempo antes do início dos sinais clínicos tenha sido a fonte de transmissão de MG. Essa bactéria pode ser transmitida de forma vertical e horizontal, direta ou indiretamente. Aves com infecções subclínicas podem ser importantes transmissores desse agente. O transporte e a mudança de ambiente, bem como outros fatores estressantes devido ao novo ambiente, também causam estresse e imunossupressão, favorecendo assim a exacerbação dos sinais clínicos e maior eliminação do agente no meio ambiente. A porta de entrada, geralmente, é o sistema respiratório superior ou a conjuntiva (Ley 2008).

A infecção por MG é uma importante causa de doença respiratória em aves de subsistência. A aplicação associada das técnicas de IHQ e de PCR em tempo real para a identificação de infecção e presença de *M. gallisepticum*, respectivamente, pode ser ferramenta importante no diagnóstico de micoplasmoses em aves, ainda mais quando associadas aos sinais clínicos e as lesões anatomopatológicas.

**Agradecimentos.-** Ao Dr. Roger Ayling do *Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Mycoplasma Group, Department of Bacteriology, Addlestone, England* por ceder gentilmente os anticorpos anti-MG e anti-MS para a realização da IHQ. À Dra. Naola Ferguson-Noel e a Dra. Monique Silva de França do *Poultry Diagnostic & Research Center, The University of Georgia, USA* por cederem gentilmente os controles positivos de MS para a IHQ. Ao Leandro S. Machado do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense e as empresas Merial e Biovet por disponibilizarem os controles positivos de MG e MS para a PCR. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Almeida P.R., Andrade C.P., Almeida L.L., Oliveira L.G.S., Castro L.A., Zlotowski P., Silva S.C. & Driemeier D. 2012. Nested-PCR for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial alveolar swabs, frozen tissues and formalin-fixed paraffin-embedded swine lung samples: comparative evaluation with immunohistochemical findings and histological features. *Pesq. Vet. Bras.* 32(8):715-720.
- Bradley L.D., Snyder D.B. & Van Deusen R.A. 1988. Identification of species-specific and inter-species-specific polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Am. J. Vet. Res.* 49:511-515.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e

- estabelecimentos avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). Diário Oficial da União. Brasília, DF, p.68-70, de 24 de agosto de 2001, Seção I.
- Buim M.R., Mettifogo E., Timenetsky J., Kleven S. & Ferreira A.J.P. 2009. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.* 29:552-556.
- Callison S.A., Riblet S.M., Sun S., Ikuta N., Hilt D., Leiting V., Kleven S.H., Suarez D.L. & García M. 2006. Development and validation of a Real-Time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected birds. *Avian Dis.* 50:537-544.
- Cookson K.C. & Shivaprasad H.L. 1994. *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants, and peafowl. *Avian Dis.* 38:914-921.
- Fabricant J. & Levine P.P. 1962. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection ("air sac" disease). *Avian Dis.* 6:13-23.
- Fletcher O.J., Abdul-Aziz T. & Barnes H.J. 2008. Respiratory system, p.128-163. In: Fletcher O.J. (Ed), *Avian histopathology*. Omni press, Madison.
- Gomes A.M., Costa L.L., Vilela D.A.R., Marques M.V.R., Carvalhaes A.G., Marin S.Y., Costa M.P., Horta R.S., Resende J.S., Martins N.R.S. 2010. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 12:75-78.
- Gross W.B. 1961. The development of "air sac disease". *Avian Dis.* 5:431-439.
- Gross W.B. 1990. Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Dis.* 34:607-610.
- Jarquín R., Schultz J., Hanning I. & Ricke S.C. 2009. Development of a Real-Time polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* under industry conditions. *Avian Dis.* 53:103-107.
- Kleven S.H. 1975. Antibody response to avian mycoplasmas. *A. J. Vet. Res.* 36:563-565.
- Kleven S.H. 2008. Mycoplasmosis, p.805-807. In: Saif Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry*. 12<sup>th</sup>ed. Blackwell, Iowa.
- Kleven S.H. & Ferguson-Noel N. 2008. *Mycoplasma synoviae* infection, p.845-856. In: Saif Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry*. 12<sup>th</sup>ed. Blackwell, Iowa.
- Ley D.H. 2008. *Mycoplasma gallisepticum* infection, p.807-834. In: Saif Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry*. 12<sup>th</sup>ed. Blackwell, Iowa.
- Machado L.S., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Almeida D.O., Silva R.C.F. & Santos L.M.M. 2012. *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. *Pesq. Vet. Bras.* 32:645-648.
- Minharro S., Linhares G.F.C., Andrade M.A., Rocha P.T., Santana A.P. 2001. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. *Ci. Anim. Bras.* 2:111-117.
- Nunoya T., Yagihashi T., Tajima M. & Nagasawa Y. 1995. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. *Vet. Pathol.* 32:11-18.
- Nunoya T., Kanai K., Yagihashi T., Hoshi S., Shibuya K. & Tajima M. 1997. Natural case of salpingitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Pathol.* 26:391-398.
- OIE. World Organization for Animal Health. Mycoplasmosis (*M. gallisepticum*). Paris, [20--?]. Disponível em: <[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)>. Acesso em: 12 outubro. 2013.
- Radi Z.A., Trampel D.W., Smith B.S., Rosenbusch R.F. & Goll F. 2000. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma gallisepticum* antigens in turkey respiratory tissues. *Avian Dis.* 44:399-407.
- Raviv Z. & Kleven S. 2009. The development of diagnostic Real-Time Taqman PCRs for the four pathogenic Avian Mycoplasmas. *Avian Dis.* 53:103-107.
- Vitula F., Peckova L., Bandouchova H., Pohanka M., Novotny L., Jira D., Kral J., Ondracek K., Osickova J., Zendulkova D., Rosenbergova K., Tremf F. & Pikula J. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* infection in the grey partridge *Perdix perdix*: outbreak description, histopathology, biochemistry and antioxidant parameters. *Vet. Res.* 7:34.
- Yilmaz F., Timurkaan N., Kiliç A., Kalender H. & Kiliç Ü. 2011. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chicken by immunohistochemical, PCR and culture methods. *Revue Méd. Vét.* 162(2):79-86.
- Yilmaz F. & Timurkaan N. 2011. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antigens by immunohistochemical method in pneumonic broiler chicken lungs. *J. Anim. Vet. Adv.* 10(19):2557-2560.

#### **4 ARTIGO 2**

Nesse item é apresentado o artigo "**Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal**" que será submetido para publicação na revista *Avian Diseases*.

**Caracterização anatomopatológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal**

Renata A. Casagrande<sup>A,B</sup>, Gustavo Machado<sup>C</sup>, Priscila R. Guerra<sup>D</sup>, Luiza A. Castro<sup>A</sup>,  
Andréia Spanemberg<sup>E</sup>, Sérgio C. Silva<sup>A</sup>, Marisa R. de Itapema Cardoso<sup>D</sup>, Luís Gustavo  
Corbellini<sup>C</sup> e David Driemeier<sup>A\*</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FaVet/UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre-RS, 91540-000, Brazil. \*Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

<sup>B</sup>Instituto Federal Catarinense, SC-283, Km 8, Vila Fragosos, Concórdia, SC 89700-000, Brasil.

<sup>C</sup>Laboratório de Epidemiologia, FAVET/UFRGS.

<sup>D</sup>Setor de Medicina Veterinária Preventiva, FAVET/UFRGS.

<sup>E</sup>Laboratório de Micologia, FAVET/UFRGS.

## RESUMO

A colibacilose é a principal causa infecciosa de condenação total de carcaça em frangos de corte no sul do Brasil. Esse trabalho tem por objetivo determinar o grau de concordância entre a condenação total por colibacilose de frangos de corte abatidos em estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) com o diagnóstico anatomopatológico. O estudo foi realizado com 45 frangos de corte condenados totalmente por colibacilose (caso) e seus respectivos 45 controles (frangos sem lesões). Em todos os frangos condenados pelo SIF havia lesões macroscópicas e, nos controles não se observou. Através do teste *Kappa-Cohen's* essas duas variáveis apresentaram concordância quase perfeita. As aves condenadas apresentaram lesões em fígado (27/45); em fígado e sacos aéreos (11/45); em fígado e coração (2/45); fígado, sacos aéreos e coração (2/45); fígado, sacos aéreos e oviduto (1/45); fígado, sacos aéreos, coração e tecido subcutâneo (1/45); e fígado, sacos aéreos, oviduto e baço (1/45). Observou-se concordância quase perfeita entre condenação e lesão hepática. Histologicamente, em 41 casos e 12 controles observaram-se lesões, sendo os mais frequentes hepatite necrosante aleatória, bronquite fibrino-heterofílica, pericardite aguda e traqueíte linfoplasmocitária. Quanto ao isolamento bacteriano, nas aves com hepatite identificou-se *E. coli*, *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (10/38) e, nas aves com bronquite ou broncopneumonia isolou-se *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva (9/14). Realizou-se PCR em tempo real de traqueia para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) e todos os frangos foram negativos. A IHQ anti-MG e anti-MS dos 33 frangos em que se observou lesão no sistema respiratório, também foram negativas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Doença bacteriana, patologia, ave, abatedouro.

## INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias são as principais responsáveis por condenações de carcaça na indústria avícola brasileira. As altas concentrações de amônia no galpão, a deficiência na ventilação de ambientes avícolas, os extremos de temperatura, a umidade da cama, as criações com alta densidade e a deficiência no processo de desinfecção são

fatores ambientais predisponentes para o desencadeamento desses problemas respiratórios (FERREIRO & KNÖBE, 2008).

A colibacilose é a principal causa infecciosa de condenação total de carcaça em frigoríficos de frangos de corte no sul do Brasil (GIOTTO *et al.*, 2008; SESTERHENN *et al.*, 2011). A colibacilose aviária caracteriza-se por uma infecção localizada ou sistêmica causada por *E. coli* patogênica para aves (APEC). Essa enfermidade tem inúmeras formas de apresentação e caracteriza-se por colisepticemia, coligranuloma, aerossaculite, celulite, peritonite, pericardite, hepatite, salpingite, artrite, osteomileite e panoftalmite (BARNES *et al.*, 2008). A infecção mais usual é a do trato respiratório que evolui para colisepticemia (JANBEN *et al.*, 2001; KABIR, 2010).

Em frangos de corte, na maior parte dos casos, os problemas respiratórios não envolvem apenas um agente. A bactéria *E. coli* participa com maior frequência, no entanto, outras enfermidades como a micoplasmose, a bronquite infecciosa, a doença de Newcastle, a laringotraqueíte infecciosa, a coriza infecciosa, a influenza aviária, a cólera e a aspergilose também podem estar envolvidas (FERREIRO & KNÖBE, 2008).

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) são considerados responsáveis por causar doença respiratória branda em frangos de corte, porém quando ocorre infecção simultânea com outros agentes patogênicos e/ou condições de manejo inadequadas, o quadro clínico-patológico pode ser severo (GROSS, 1961; FABRICANT *et al.*, 1962; GROSS, 1990; LEY, 2008; KLEVEN & FERGUSON-NOEL, 2008). As lesões no trato respiratório aumentam as condenações de carcaças em abatedouros (MINHARRO *et al.*, 2001; SENTÍES-CUÉ *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2012) e tornam as aves mais susceptíveis a infecções secundárias, principalmente por *E. coli* (ALENCAR *et al.*, 1998; KLEVEN & FERGUSON-NOEL, 2008; LEY, 2008).

A avaliação e o estudo de lesões encontradas durante o abate de aves em frigoríficos são reconhecidos como um método importante de monitoramento de enfermidades em criações comerciais (ANSONG-DANQUAH, 1987). Além das informações relacionadas ao desempenho zootécnico de cada lote, os dados referentes à condenação parcial ou total das carcaças são fundamentais para que se possam fazer correções no manejo e no programa sanitário.

No Brasil não há estudos que correlacionem às lesões macroscópicas de causa infecciosa observadas em abatedouros de frango de corte com a caracterização histológica e o isolamento do agente presente nos órgãos lesionados. Essa tríade de

diagnóstico é fundamental para que se estimem o real impacto dos agentes infecciosos como causa de condenação de carcaças.

Esse trabalho tem por objetivo: (1) determinar o grau de concordância entre a condenação total por colibacilose de frangos de corte abatidos em estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Estado do Rio Grande do Sul com o diagnóstico anatomopatológico; (2) caracterizar as lesões anatomopatológicas encontradas em frangos de corte com condenação totalmente por colibacilose; (3) realizar reação em cadeia da polimerase (PCR) e imuno-histoquímica (IHQ) para MG e MS; (4) realizar isolamento bacteriano dos órgãos com lesões.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Definição da população-alvo**

Utilizou-se frangos de corte em idade de abate (35 a 45 dias) provenientes de um abatedouro sob SIF, localizado no Estado do Rio Grande do Sul. O estudo foi conduzido nos frangos com condenação total por colibacilose.

### **2. Definição do n Amostral**

O n amostral foi calculado da seguinte forma: a população de estudo (N) foi o número médio de aves abatidas/dia (470.000 aves/dia) no referido abatedouro. O cálculo da amostra considerou uma prevalência esperada de 0,125% de condenação total por colibacilose (dado obtido junto ao SIF), nível de confiança de 90% e erro  $\alpha$  de 10%, resultando numa amostra de 42 aves/dia. Para cada ave condenada por colibacilose (caso), uma ave normal do mesmo lote também foi coletada (controle).

### **3. Critério de condenação**

A avaliação e a condenação das carcaças foram realizadas pelos funcionários do SIF de acordo com os critérios de condenação de carcaça de aves estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Em relação a colibacilose, qualquer órgão ou parte da carcaça que estivesse afetado por um processo inflamatório era condenado (condenação parcial) e, quando havia evidência sistêmica do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade eram condenadas (condenação total) (BRASIL, 1998).

#### **4. Colheita e processamento de amostras**

Realizou-se cinco coletas, com intervalo de dois dias cada, todas no mês de outubro de 2012. Em cada dia de coleta, 10 frangos (uma ave por lote) condenados totalmente por colibacilose (caso) foram coletados, diretamente na linha de inspeção, totalizando 50 aves. De cada lote, colheu-se um frango normal (controle). Devido a falta de órgãos para a análise, que foram perdidos durante a coleta no abatedouro, excluiu-se cinco casos e seus respectivos controles, restando assim 45 casos com os respectivos controles.

As aves foram mantidas refrigeradas por no máximo seis horas e enviados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FaVet/UFRGS). Todas as aves foram pesadas e após realizou-se a necropsia. Fragmentos de traqueia, pulmão, sacos aéreos, coração, fígado, baço, rins, nervo ciático, pele, medula óssea, bursa de Fabrícus, timo, esôfago, proventrículo, moela, intestino delgado e grosso foram colhidos, fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para análise histopatológica e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Colorações especiais, como Tricrômico de Masson (TM) e hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory (PTAH) foram realizadas em pulmão, fígado e sacos aéreos com lesões histológicas.

Suabes de traqueia, bem como fragmentos de pulmão e fígado de todas as aves foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização de exame microbiológico e PCR.

#### **5. Exame Microbiológico**

As amostras congeladas de fígado e pulmões com lesões compatíveis com infecção bacteriana detectadas através do exame histopatológico foram encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da FAVET/UFRGS. Os fragmentos foram colhidos assepticamente e submetidos ao cultivo bacteriano aeróbio em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar MacConkey. As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24-72 horas. Após, realizou-se a identificação bacteriana através da observação macroscópica das colônias, da morfologia microscópica e do perfil bioquímico dos isolados. Os testes bioquímicos empregados foram a detecção das enzimas catalase, verificação de citocromo oxidase, fermentação

de carboidratos, produção de urease, hidrólise de gelatina, utilização de citrato e degradação de aminoácidos.

Realizou-se também a pesquisa de *Salmonella* sp. nas amostras. Utilizou-se para o enriquecimento seletivo o caldo Tetrionato e caldo Rappaport-Vassiliadis, ambos foram incubados a 42°C por 24 horas. Após, as amostras foram plaqueadas em meio ágar XLD e incubadas a 37°C durante 48 horas. A identificação dos isolados foi realizada através da caracterização do perfil bioquímico, da verificação de citocromo oxidase, produção de urease, fermentação da glicose, sacarose e lactose em meio TSI (*triple sugar iron agar*), detecção da beta-galactosidade, descarboxilação da lisina, produção de H<sub>2</sub>S (sulfureto de hidrogênio), motilidade e produção de indol. Para a confirmação final foi realizada a prova de soroaglutinação.

## **6. Imuno-histoquímica para *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae***

Dos casos de condenação por colibacilose em que evidenciou-se-se lesão inflamatória em pulmões, traqueia e sacos aéreos, esses foram submetidos à IHQ anti-MG e anti-MS conforme descrito por Yilmaz *et al.* (2011a,b).

As amostras foram submetidas à IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos numa solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.) em metanol durante 10 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato pH 6 por quatro ciclos de cinco minutos cada em micro-ondas com potência de 750 W. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com *Protein block* (DakoCytomation®) por 7 minutos, à temperatura ambiente. Utilizou-se os anticorpos primários anti-*Mycoplasma gallisepticum* e anti-*M. synoviae* policlonais produzidos em coelhos (Weybridge Lab.) na diluição 1:800 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas a 37 °C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation®) 20 minutos cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469, DakoCytomation®). Para contracorar foi utilizada a hematoxilina de Mayer seguida de montagem em meio aquoso (S1964, DakoCytomation). Como controle positivo foi utilizado um corte histológico de traqueia com lesões histopatológica compatíveis com micoplasmose e PCR positivo para MG e para MS utilizou-se corte histológico de

traqueia inoculado com o isolado k1968. Controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por PBS.

### **7. Detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* por PCR em tempo real**

Realizou-se PCR em tempo real para MG e MS de suabe de traqueia dos casos de colibacilose. O DNA total foi extraído e purificado dos suabes de traqueia utilizando o kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliar a qualidade do DNA extraído e a presença de possíveis inibidores na reação, foram adicionados 2 µL/amostra de Xeno (controle interno positivo) no tampão de lise antes da extração. Os DNAs foram recuperados em um volume de eluição de 100 e utilizados 5 µL de DNA em cada reação.

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando as sondas *Taqman*<sup>®</sup> e oligonucleotídeos do kit comercial MG/MS *Custom assay* (Life Technologies<sup>®</sup>) e enzimas, dNTPs, ROX, tampões e controle interno positivo (Xeno controle) contidos no *kit VetMAX-Plus qPCR Master Mix* (Life Technologies<sup>®</sup>). PCR em tempo real foi feito no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Os ciclos de amplificação foram aqueles sugeridos pelo fabricante, a saber: 95 °C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos.

Como controles positivos foram utilizadas as bacterinas comerciais Myco-Galli MG-70 (Biovet<sup>®</sup>) para *M. gallisepticum* e Mycovax MS-H (Merial<sup>®</sup>) para *M. synoviae*. O conteúdo liofilizado de um frasco de cada bacterina contendo 1.000 doses (aproximadamente 10<sup>7</sup> CCU/dose) foi ressuscitado em 30 mL de PBS, e uma alíquota de 500 µL foi aquecida a 95 °C por 10 minutos, centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm, e 1 µL do sobrenadante foi utilizado diretamente na reação. Para a quantificação do número de CCU (*color-changing units*) em cada amostra, foi realizada uma curva padrão de cada controle positivo nas seguintes diluições: 1:1, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:10.000. Foram adicionados 2 µL do controle Xeno diretamente nas reações controle positivas. As amostras apresentando Ct (ciclo *threshold*) menor que 40 foram consideradas positivas.

## 8. Imuno-histoquímica para marcadores celulares

Dos casos de condenação por colibacilose em que observou-se lesão inflamatória em pulmões e fígado, esses foram submetidos à IHQ para caracterização do processo inflamatório.

As amostras foram submetidas à IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos tecidos em solução a 10% de peróxido de hidrogênio em metanol durante 15 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato, pH 6 por três minutos a 125 °C para o anticorpo monoclonal anti-citoqueratina, (clones AE1/AE3, DakoCytomation®) e proteinase K (DakoCytomation®) por 10 minutos, à temperatura ambiente para o anticorpo policlonal anti-lisozima (Clone EC 3.2.1.17, DakoCytomation). O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com leite desnatado Molico® a 5% por 20 minutos, à temperatura ambiente. Os anticorpos anti-citoqueratina e anti-lisozima foram diluídos em 1:80 e 1:200 respectivamente em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida durante o período de 14-16 horas (*overnight*) a 4 °C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation®) por 20 minutos em cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi 3,3'-diaminobenzidina (DAB, K3468, DakoCytomation®) e para a contracoloração a hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado um corte histológico de carcinoma (citoqueratina) e um histiocitoma canino (lisozima).

## 9. Análises estatísticas

Para análise dos dados, os mesmos foram armazenados em planilhas *Excel* e analisados por meio de estatística descritiva, distribuição de frequências, construção de tabelas de contingência e teste de concordância *Kappa-Cohen's*.

Todas as análises foram realizadas no R v.2.15.2 (*R development Core Team*, 2012). Para a análises do estudo caso-controle foi utilizado a regressão logística (HOSMER & LEMESHOW, 2000), com o objetivo de verificar se há associação entre o grupo caso e controle causada pela lesões das carcaças. O estudo contou com proporção de casos e controles da ordem de *m:m* (1:1). A regressão foi utilizada para verificar a relação entre a variável dependente (presença ou ausência de colibacilose-condenação da carcaça na linha de abate) e as variáveis independentes no estudo de caso-controle

(peso, lesões macroscópicas e histológicas).

A variável dependente foi a condenação por colibacilose (caso=45) codificada 1 e ausência de condenação (controle=45) codificada 0. As variáveis independentes foram primeiramente analisadas para verificação da consistência dos dados. Variáveis com valores faltantes (>10%) e com variabilidade (<20%) não foram consideradas para posterior análise.

## RESULTADOS

Nesse estudo foram coletados 45 frangos de corte condenados totalmente por colibacilose (caso) e seus respectivos 45 controles. Cada caso pareado ao controle era provenientes de um lote, totalizando 45 lotes, originários de 22 produtores, distribuídos em 12 municípios diferentes, do estado do Rio Grande do Sul. O número total de aves abatidas por lote foi de 14.232 a 64.924, com média de 40.290 aves por lote. O percentual de condenação total por colibacilose nesses lotes variou de 0,0027 a 0,0877%, com média de 0,025%. Quanto ao pesos dos frangos condenados e controles, a média foi de 1,081kg com coeficiente de variação de 0,184kg, peso mínimo de 0,6kg e máximo de 1,52kg.

Dos 45 frangos condenados pelo SIF, todos apresentaram alterações macroscópicas e, das 45 aves normais (controles) não se observou lesão (Tabela 1). Dos 45 frangos com lesões macroscópicas, 41 apresentaram lesões histológicas através da coloração de HE e dos 45 controles que não tinham lesões macroscópicas, 12 apresentaram lesões histológicas conforme pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 1. Frequência de frangos de corte condenados totalmente por colibacilose e dos controles com lesões macroscópicas**

Condenação	Lesão macroscópica		Total
	Ausência de alterações	Presença de alterações	
Normal	45	0	45
Condenado	0	45	45
Total	45	45	90

Através do teste *Qui-quadrado*, as variáveis condenação e avaliação macroscópica ( $X^2=86.04$ ,  $p<0.001$ ), condenação e histopatologia ( $X^2=86.04$ ,  $p<0.001$ ) são dependentes. Utilizando o teste *Kappa-Cohen's* para avaliar o grau de concordância

entre essas variáveis, observou-se que condenação e avaliação macroscópica apresentam concordância quase perfeita ( $Kappa=1/ p<0,05$ ), condenação e histopatologia ( $Kappa=0,644/ p<0,05$ ), bem como avaliação macroscópica e histopatologia com concordância substancial ( $Kappa=0,644/ p<0,05$ ).

**Tabela 2. Frequência de frangos de corte condenados totalmente por colibacilose e dos controles com lesões macroscópicas e histológicas**

Lesão histológica	Lesão macroscópica		Total
	Ausente	Presente	
Ausente	33	4	37
Presente	12	41	53
Total	45	45	90

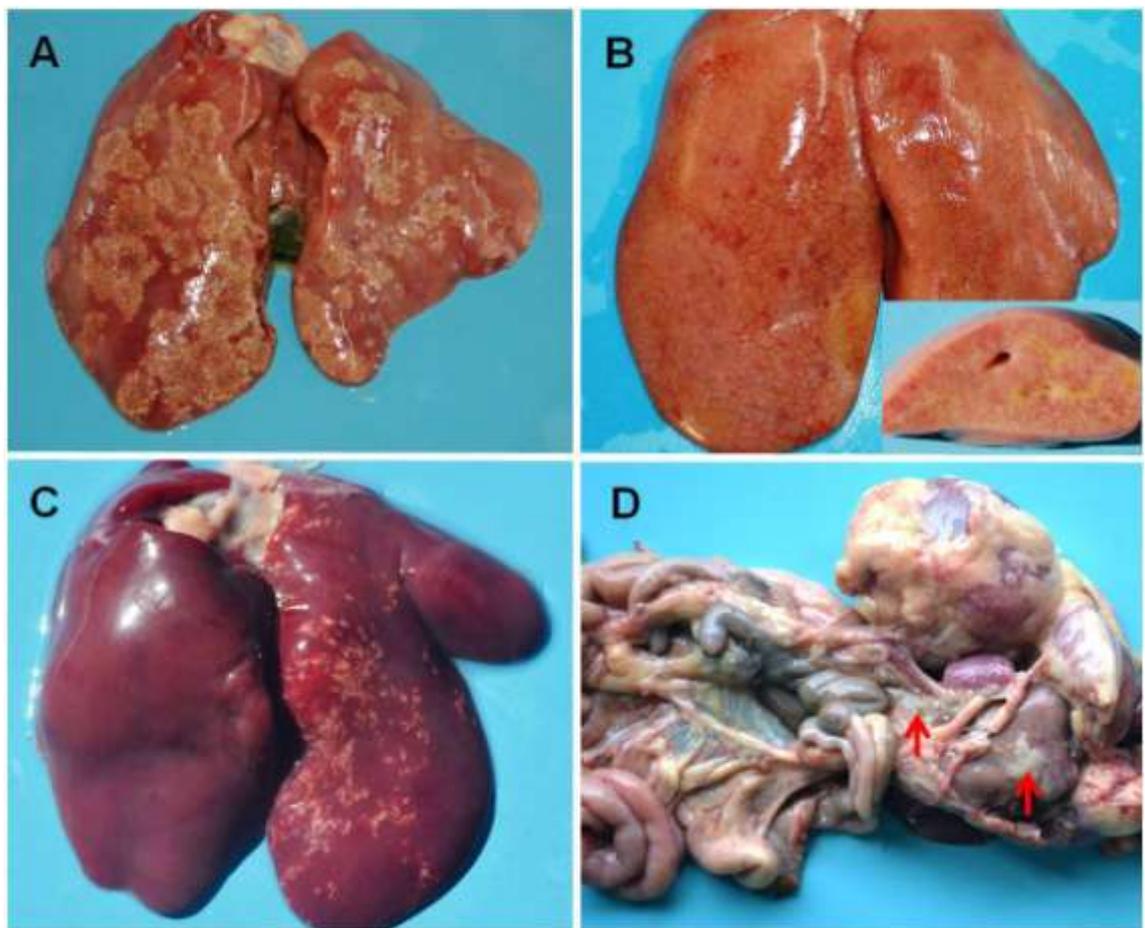
Quanto à distribuição das lesões macroscópicas, as aves condenadas por colibacilose apresentaram alterações em fígado (27/45); em fígado e sacos aéreos (11/45); em fígado e coração (2/45); fígado, sacos aéreos e coração (2/45); fígado, sacos aéreos e oviduto (1/45); fígado, sacos aéreos, coração e tecido subcutâneo (1/45); e fígado, sacos aéreos, oviduto e baço (1/45).

Para avaliar o grau de concordância entre a condenação por colibacilose e a presença de lesão macroscópicas nos diferentes órgãos utilizou-se o teste *Kappa-Cohen's*. Havia concordância quase perfeita entre condenação e lesão no fígado ( $Kappa=0,844/ p<0,05$ ), concordância leve com lesão no coração ( $Kappa=0,244/ p<0,05$ ), concordância pobre com lesão em sacos aéreos e pulmões ( $Kappa=0,133/ p<0,05$ ) e, nenhuma concordância com lesão em traqueia ( $Kappa=-0,666/ p<0,05$ ).

Das 45 aves com lesões macroscópicas no fígado, em 38 também evidenciou-se lesões histológicas. A macroscopia desses casos era caracterizada principalmente por fígado moderadamente aumentado de tamanho com pontos esbranquiçados de 1 a 5mm, firmes, multifocais a coalescentes com aspecto estrelado, na superfície capsular (Figura 1A) e parênquima (23/38), entremeados a áreas esverdeadas (4/38) e com deposição de fibrina sobre a cápsula (7/38); com manchas esverdeadas de aspecto estrelado (3/38); e severamente aumentado, firme, padrão lobular e ductos biliares evidentes (Figura 1B) (1/45). Nos sete casos em que se observou lesões macroscópicas em fígado, porém sem alterações histológicas, essas eram caracterizadas por aumento discreto associado a manchas esverdeadas (3/7); coloração pálida e padrão lobular discretamente evidente (1/7); coloração vermelho-escura e pontos esbranquiçados de 1mm multifocais na

superfície capsular (Figura 1C) (1/7); moderado aumentado e palidez difusa (1/7); e palidez com manchas avermelhadas (1/7).

Macroscopicamente, as lesões observadas em sacos aéreos era caracterizada por moderada deposição de espuma (14/16) e espessamento com moderada deposição de cáseo (Figura 1D) (2/16). No coração evidenciou-se, em saco pericárdico, deposição de fibrina difusa moderada (1/4) ou discreta (2/4) e líquido translúcido moderado (1/4). O oviduto estava com lúmen preenchido por cáseo (2/2), o baço diminuído de tamanho e recoberto por fibrina (1/1) e o subcutâneo com deposição de cáseo moderado (1/1).



**Figura 1.** Frangos de corte condenados totalmente por colibacilose. **(A)** Fígado moderadamente aumentado de tamanho com pontos esbranquiçados de 1 a 5mm, firmes, multifocais a coalescentes com aspecto estrelado, na superfície capsular. **(B)** Fígado severamente aumentado e padrão lobular evidente. Destaque: superfície de corte com padrão lobular e ductos biliares evidentes. **(C)** Fígado com coloração vermelho-escura e pontos esbranquiçados de 1mm multifocais na superfície capsular. **(D)** Sacos aéreos e fígado com moderada deposição de fibrina (setas).

Na avaliação histopatológica dos casos condenados por colibacilose, 38 apresentaram lesão em fígado, 13 em pulmões e coração, seis em sacos aéreos e traqueia. Das 45 aves controles que não apresentavam lesões macroscópicas, em 12 havia lesões histopatológicas, sendo nove em traqueia, sete em pulmões e duas em coração. A caracterização das lesões histológicas encontram-se na Tabela 3.

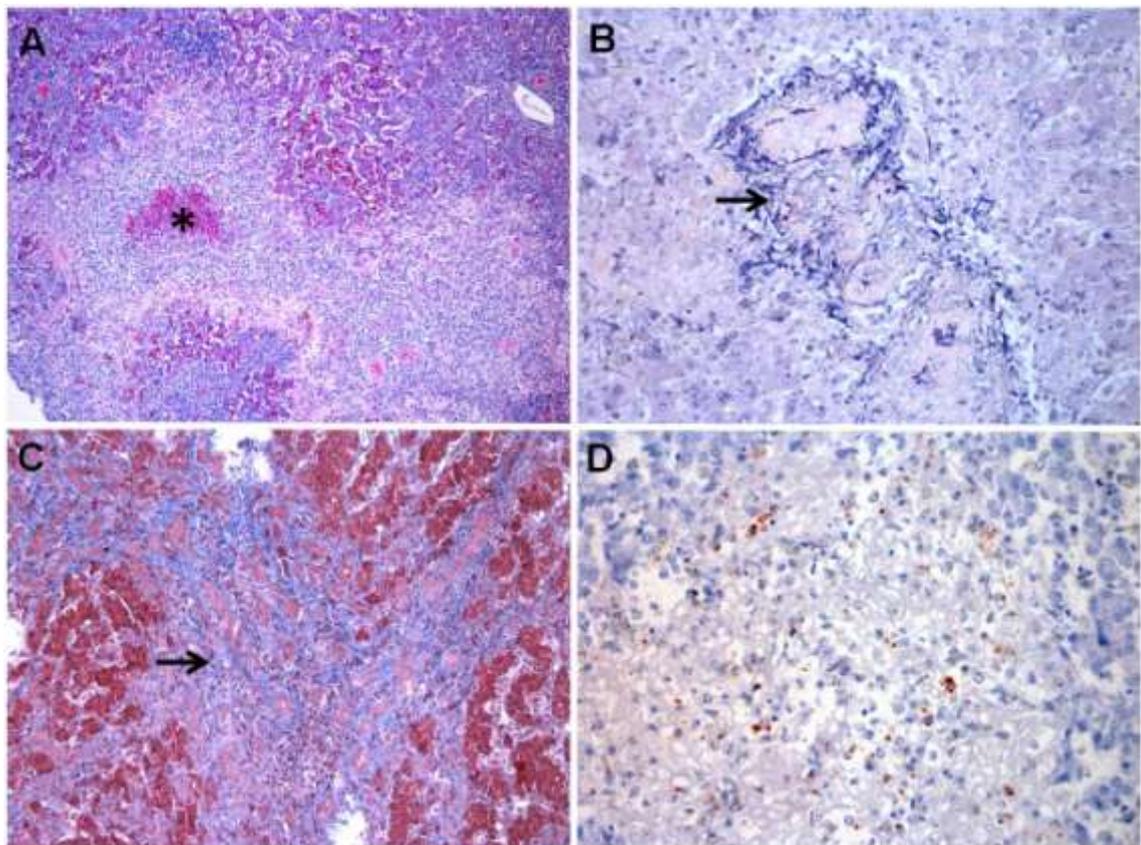
**Tabela 3. Caracterização das lesões histopatológicas em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose**

<b>Órgão</b>	<b>Diagnóstico histopatológico</b>	<b>Nº Animais</b>
Fígado	Hepatite necrosante aleatória	33
	Hepatite aguda aleatória	2
	Hepatite crônica-ativa	3
Pulmões	Bronquite fibrino-heterofílica	11
	Broncopneumonia fibrino-heterofílica	2
	Broncopneumonia fibrino-heterofílica necrótica	1
	Hiperplasia do tecido linfoide peribronquial (BALT)	6
	Trombose pulmonar	1
Coração	Pericardite aguda	14
	Pericardite crônica	1
Traqueia	Traqueíte linfoplasmocitária	13
Sacos aéreos	Aerossaculite aguda	4
	Aerossaculite crônica	2
Oviduto	Salpingite aguda	2
Baço	Esplenite aguda	1
Tecido subcutâneo	Celulite aguda	1

Assim como foi observado na avaliação macroscópica, a principal lesão histológica nos casos de colibacilose foi em fígado. O diagnóstico mais prevalente foi de hepatite necrosante aleatória que era caracterizada por necrose fibrinoide multifocal a coalescente variando de discreta a acentuada, circundada por intenso infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Figura 2A). Em muitos casos havia focos de necrose circundada por macrófagos e células gigantes multinucleadas. Através da coloração de PTAH pode-se comprovar filetes delgados de fibrina nas áreas de

necrose (Figura 2B). Nesses casos havia também infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos multifocal moderado a acentuado na região portal.

Diagnosticou-se também hepatite aguda, caracterizada por infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos multifocal moderado a acentuado. Nos casos de hepatite crônica-ativa evidenciou-se extensas áreas de necrose fibrinoide multifocal a coalescente acentuada, circundada por infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Havia ainda proliferação de ductos biliares e fibrose portal ou em ponte, difusa moderada, que foi evidenciada através da coloração de TM (Figura 2C). Os macrófagos evidenciados nas áreas de inflamação apresentaram moderada marcação anti-lisozima (Figura 2D).



**Figura 2.** Fígado de frangos de corte condenados totalmente por colibacilose. (A) Hepatite necrosante aleatória (asterisco). HE. Obj.10. (B) Evidenciação de fibrina de coloração azul em meio a hepatite necrótica (seta). Hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory. Obj.40. (C) Hepatite crônica-ativa com proliferação de ductos biliares e fibrose portal ou em ponte, difusa moderada (seta). Tricrômico de Masson. Obj.20. (D) Macrófagos nas áreas de hepatite com marcação anti-lisozima. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj.40.

Os pulmões foram o segundo órgão com maior número de casos com lesões histológicas, apesar de não ter alterações na avaliação macroscópica. Nesse órgão diagnosticou-se bronquite fibrino-heterofílica, caracterizada por deposição de fibrina, debris celulares, infiltrado de heterófilos e macrófagos no lúmen de brônquios secundários, focal discreto. Nos casos de broncopneumonia fibrino-heterofílica, além das lesões descritas, havia inflamação no lúmen dos parabronquios (Figura 3A). Observou-se também broncopneumonia fibrino-heterofílica necrótica caracterizada por necrose caseosa no lúmen de parabronquios e brônquios secundários, circundada por infiltrado de macrófagos, heterófilos, linfócitos e plasmócitos focal moderado.

Através da coloração de PTAH pode-se comprovar a presença dos filetes delgados de fibrina em meio ao processo inflamatório dos pulmões (Figura 3B). A IHQ utilizando marcadores celulares para caracterização do infiltrado inflamatório demonstrou que não havia proliferação de células epiteliais, pois o anticorpo anti-citoqueratina apresentava marcação apenas no epitélio de revestimento dos parabronquios (Figura 3C), brônquios primários e secundários. Em meio ao processo inflamatório havia intensa marcação em macrófagos para lisozima (Figura 3D).

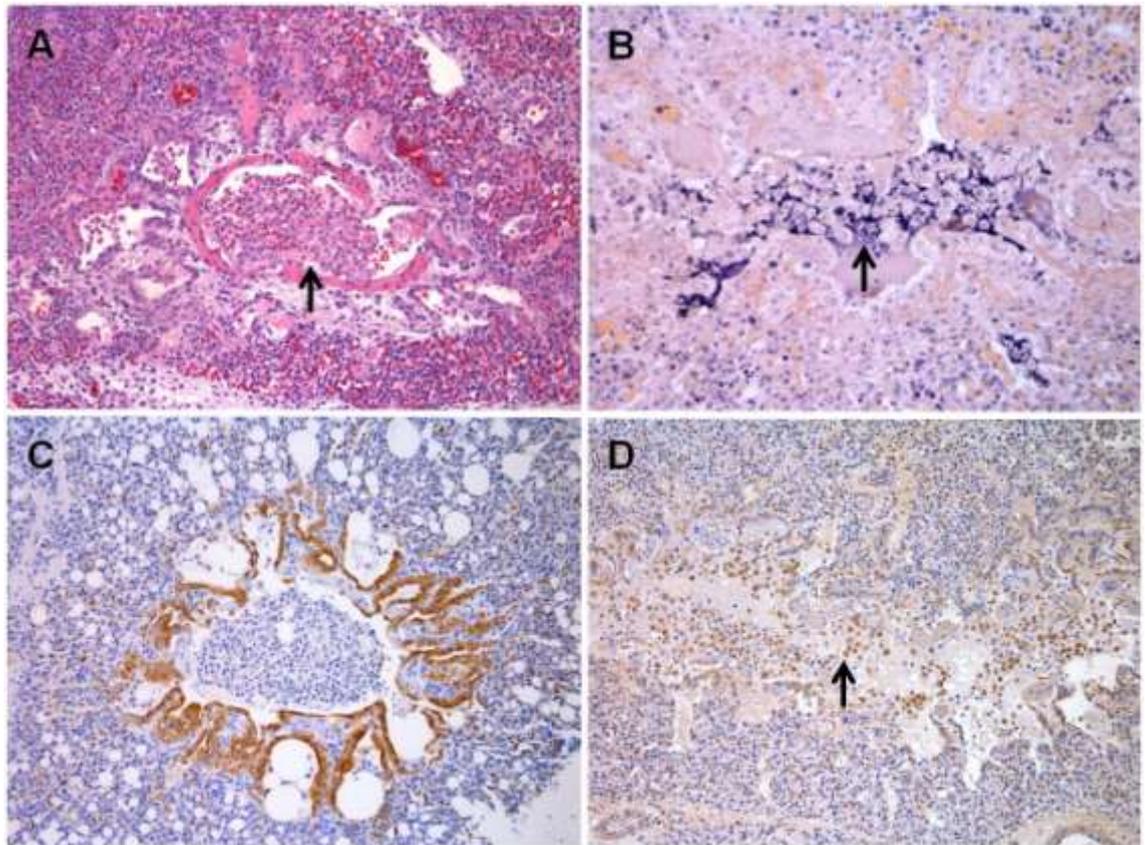
Na traqueíte linfoplasmocitária observava-se hiperplasia do epitélio discreta associada a infiltrado predominante de linfócitos e plasmócitos difuso discreto a moderado na mucosa. A pericardite, aerossaculite, salpingite, celulite e esplenite agudas caracterizavam-se por exsudação de fibrina, infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos focalmente extensa discreta a moderada e, a pericardite e aerossaculite crônicas por proliferação de fibroblastos e infiltrado de macrófagos focal moderado.

Além das lesões de colibacilose, em 43/90 frangos havia em intestino delgado e ceco grande quantidade de *Eimeria* sp. em diferentes fases do desenvolvimento no citoplasma das células da mucosa, em intensidade que variava de discreta a acentuada. Os demais órgãos avaliados (rins, bursa de *Fabricius*, timo, medula óssea e nervo ciático, esôfago, proventrículo e moela) não apresentaram lesões anatomopatológicas.

Todos os pulmões e fígados que apresentaram lesões foram encaminhados para exame microbiológico. Nos 38 frangos de corte com hepatite, em 10 houve isolamento bacteriano, sendo identificado *E. coli* (7/10), *Enterococcus* sp. (1/10), *Streptococcus* sp. (1/10) e *E. coli* associado a *Enterococcus* sp (1/10). Nos 14 frangos de corte que apresentavam bronquite ou broncopneumonia, em nove houve crescimento bacteriano,

sendo isolado *E. coli* (5/10) e *Staphylococcus* coagulase positiva (4/10). Em nenhum desses casos isolou-se *Salmonella* sp.

Realizou-se PCR em tempo real para MG e MS de suabe de traqueia dos 90 frangos (casos e controles) e, todos foram negativos. A IHQ anti-MG e anti-MS dos 33 frangos em que se observou lesão no sistema respiratório, também foram negativas.



**Figura 3.** Pulmões de frangos de corte condenados totalmente por colibacilose. (A) Broncopneumonia fibrino-heterofílica (seta). HE. Obj.20. (B) Evidenciação de fibrina de coloração azul em meio ao processo inflamatório (seta). Hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory. Obj.40. Imuno-histoquímica: (C) Marcação anti-citoqueratina apenas no epitélio de revestimento dos parabrônquios. (D) Intensa marcação anti-lisozima em macrófagos (seta). Estreptavidina-biotina-peroxidase. Obj.20.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O serviço de inspeção de carcaças é considerado um exame de triagem (*screening test*). Como todo teste de triagem, erros podem ser cometidos durante a classificação das lesões observadas nos animais abatidos. Nesse estudo a condenação das carcaças total por colibacilose realizada pelo SIF e a avaliação macroscópica apresenta grau máximo de concordância. No Canadá, um estudo foi conduzido para determinar o grau de concordância entre a causa de condenação e o diagnóstico *post mortem*. A concordância foi considerada excelente nos casos de condenação por sangria inadequada, hematoma e celulite, muito bom nos casos de fraturas/mutilações, bom nos casos de hepatite e ascite e ruim nos casos de cianose, doença respiratória crônica, caquexia e papo penduloso (BISSAILLON *et al.*, 1988).

Através desse estudo pode-se observar que o serviço de inspeção apresenta grande confiabilidade, pois as carcaças de frangos que apresentaram lesões macroscópicas foram condenadas. No entanto, havia discordâncias quanto a classificação das lesões. A maioria das aves foram condenadas totalmente por colibacilose por apresentarem apenas lesões hepáticas. Em sete desses frangos com lesões na avaliação macroscópica, não apresentaram lesão no exame histopatológico. Portanto, essas alterações de cor devem ter ocorrido em função do abate (sangria e pendura) ou eram lesões de pouco significado, como os pontos brancos na superfície capsular hepática.

Os casos sistêmicos de infecção por *E. coli* geralmente são causados por infecções primária no trato respiratório que se disseminam para diversos órgãos. Nesses casos observa-se traqueíte, pneumonia, aerossaculite, pericardite e polisserosite (BARNES *et al.*, 2008; JANBEN *et al.*, 2001). Nesse estudo, nos casos condenados por colibacilose, em apenas cinco evidenciou-se essa forma disseminada, com comprometimento de sacos aéreos e demais órgãos. Em 11 casos condenados observou-se hepatite e espuma em sacos aéreos. No entanto, na maioria dos casos que havia espuma em sacos aéreos não havia lesão no exame histopatológico. Essa espuma é um indicativo de deposição de fibrina nos sacos aéreos (FLETCHER *et al.*, 2008). No entanto, nesse estudo em animais de abatedouros, que já foram eviscerados, pode ser apenas um artefato de abate.

Em frangos de corte, a maioria dos casos de colibacilose de origem respiratória, não envolvem apenas a bactéria *E. coli*, outras enfermidades como micoplasmose,

bronquite infecciosa e aspergilose, também podem estar envolvidas (GROSS, 1961; FABRICANT & LEVINE, 1962; GROSS, 1990; MINHARRO *et al.*, 2001; FERREIRO & KNÖBE, 2008). Nesse estudo não se observou lesões sugestivas de aspergilose e todos os lotes eram vacinados para bronquite infecciosa. A traqueíte linfoplasmocitária observada em algumas aves pode ser uma seqüela da vacina contra o vírus da bronquite (CAVANAGH & GELB, 2008).

Em galinhas, a infecção por MG pode causar a Doença Respiratória Crônica (DRC), geralmente com o envolvimento de *E. coli* (GROSS, 1961; FABRICANT & LEVINE, 1962; GROSS, 1990; MINHARRO *et al.*, 2001). No entanto, nesse estudo em nenhum caso de colibacilose com lesão no sistema respiratório, identificou-se MG e MS pela PCR em tempo real ou pela IHQ anti-MG e anti-MS. Isso demonstra o esforço de muitas empresas brasileiras, através de corretos programas de biossegurança, para eliminar esses agentes dos plantéis.

No Brasil, 250 surtos de micoplasmose por MG foram notificados nos últimos cinco anos (2008-2012) (OIE 2013). Buim *et al.* (2009) realizaram-se PCR para MG e MS de suabe traqueal e embriões bicados de 33 estabelecimentos de aves de postura, matrizes, frangos de corte e um incubatório, localizados nos Estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, os quais apresentavam problemas respiratórios ou queda na produção de ovos. A prevalência de MS e MG foi de 33,33% e 9,09% respectivamente.

Em um estudo em abatedouro sob SIF no Estado do Rio Grande do Sul identificou-se, através da PCR, MG de suabe de traqueia em 20% dos lotes avaliados (8/40). Nesse trabalho havia relação entre a positividade de MG com aumento na condenação por aerossaculite e com o baixo peso dos lotes (MACHADO *et al.*, 2012). Já em abatedouros sob SIF no Estado de Goiás identificou-se através da PCR do saco aéreo de frangos de corte condenados por aerossaculite MG em 32,2% (10/31) dos lotes, MS em 25,8% (8/31) e isolou-se *E. coli* em 80,6% (25/31). Houve associação de *E. coli* com MS, MG e com ambos em 16,13% (5/31), 12,9% (4/31) e 9,68% (3/31) respectivamente (MINHARRO *et al.*, 2001).

*E. coli* patogênica para aves (APEC), também pode ter origem intestinal, no entanto, essa forma é incomum em frangos e frequente em perus. Quando a origem da infecção é intestinal, comumente se visualiza hepatite e esplenite fibrinonecroticas, que pode se disseminar para diversos órgãos (NEWBERRY *et al.*, 1993; BARNES *et al.*, 2008). A maioria das aves condenadas por colibacilose apresentaram apenas lesões

hepáticas, o que pode sugerir uma origem bacteriana intestinal. Um grande número dos frangos apresentaram lesões intestinal causada por *Eimeria* sp. Portanto, esse protozoário pode ter causado injúrias, favorecendo a penetração da APEC na mucosa intestinal e colonização de outros órgãos, como o fígado (BARNES *et al.*, 2008; KABIR, 2010).

Nos 38 frangos de corte com hepatite, em apenas 10 houve isolamento bacteriano. Esse baixo índice pode ter ocorrido devido ao fato do agente infeccioso já ter sido combatido pelo organismo, apesar da lesão ainda estar presente. Outra possível causa é que nesse estudo não se realizou a pesquisa de bactérias anaeróbicas. Infecção subclínicas por *Clostridium perfringens* em frangos pode causar hepatite e colângio-hepatite e condenação desse órgão (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999; BARCELLOS *et al.*, 2006). Essas lesões hepáticas podem estar relacionadas a enterite necrótica causada por *C. perfringens* (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999). *Clostridium perfringens* é um patógeno oportunista, presente no intestino das aves, e a lesão causada pela infecção por *Eimeria* sp. tem sido considerada como um importante fator predisponente da enterite necrótica (VAN IMMENSEEL *et al.*, 2004).

Nesse estudo além de *E. coli*, outras bactérias como *Staphylococcus* coagulase positiva, *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp. foram isoladas dos casos de hepatite e broncopneumonia. Essas bactérias, comumente fazem parte da microbiota do sistema digestório e respiratório, podem causar infecções sistêmicas aguda ou crônica, geralmente secundária a lesões causadas por outros agentes ou fatores imunossupressores (PECKHAM, 1966; SANDHU, 1988; LINARES & WIGLE, 2001).

Através dos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que 1) a condenação das carcaças total por colibacilose, realizada pelo SIF, apresentou grau máximo de concordância com a avaliação macroscópica *post mortem*; 2) o fígado foi o principal órgão acometido por lesões, sendo assim, nesses casos, o critério de condenação deveria ser reavaliado, sugerindo condenação por hepatite e não por colibacilose, uma vez que diversas espécies de bactérias podem causar hepatite em frangos; 3) colibacilose com envolvimento respiratório apresentou baixa prevalência e nenhum desses casos foi relacionado a infecção por MG e MS; 4) além de *E. coli*, outras bactérias também foram isoladas dos frangos com condenados por colibacilose; 5) um grande percentual dos frangos apresentaram lesões causadas por *Eimeria* sp., portanto mais estudos devem ser conduzidos para determinar a real importância desse

agente como fator desencadeante de processos infecciosos bacterianos em frangos de corte.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, A. P.; NASCIMENTO, E. R.; DANELLI, M. G. M.; LIGNON, G. B.; SANTOS, M. A. J.; NASCIMENTO, M. G. F. Relação entre infecção por *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* e lesões de sacos aéreos em frangos de corte. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.257-262, 1998.
- ANSONG-DANQUAH, J. A survey of carcass condemnation at a poultry abattoir and its application to disease management. **The Canadian Veterinary Journal**, v.28, p.53-56, 1987.
- BARCELOS, A. S.; FLÔRES, M. L.; KOMMERS, G. D.; NASCIMENTO, V. P.; SEGABINAZI, S. D.; ANTONIAZZI, T.; LOPES BASSAN, J. D. L. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v.36, p.561-567, 2006.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J.P. Colibacillosis In: SAIF Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 691-737.
- BISAILLON, J. R.; MEEK, A. H.; FELT, T. E. An assessment of condemnations of broiler chicken carcasses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.269-176, 1988.
- BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. In: BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 17-22, de 05 de março de 1999, Seção I.
- BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.552-556, 2009.
- CAVANAGH, D.; GELB, J. Infectious Bronchitis. In: SAIF Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 117-135.
- FABRICANT, J.; LEVINE, P. P. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection ("air sac" disease). **Avian Diseases**, v.6, p.13-23, 1962.
- FERREIRA, A. J. P.; KNÖBE, T. Enfermidades Bacterianas. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2008, 435-563p.
- FLETCHER, O. J.; ABDUL-AZIZ, T.; BARNES, H. J. Respiratory system. In: FLETCHER O. J. (Ed), **Avian histopathology**. Omni press: Madison, 2008, p.128-163.

GIOTTO, D. B.; ZIMERMANN, F. C.; CESCO, M. A. O.; BORGES FORTES, F.B.; PINHEIRO, D.; HILLER, C.C.; HERPICH, J.; MEDINA, M.; RODRIGUES, E.; SALLE, C. T. P. Impacto econômico de condenações *post mortem* de frango de corte em um matadouro frigorífico na região sul do Brasil. 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0701-2.pdf>> Acesso em: 10 janeiro 2012.

GROSS, W. B. The development of "air sac disease". **Avian Diseases**, v.5, p.431-439, 1961.

GROSS, W. B. Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens. **Avian Diseases**, v.34, p.607-610, 1990.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. Wiley: New York, 2000, 392p.

JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, p.371-378, 2001.

KABIR, S. M. L. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, p.89-114, 2010.

KLEVEN, S. H; FERGUSON-NOEL, N. *Mycoplasma synoviae* infection. In: SAIF Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 845-856.

LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: SAIF Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 807-834.

LINARES, J. A.; WIGLE, W. L. *Staphylococcus aureus* pneumonia in turkeys poult with gross lesions resembling aspergillosis. **Avian Diseases**, v. 45, p.1068-1072, 2001.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, p.345-351, 1999.

MACHADO, L. S.; NASCIMENTO E. R.; PEREIRA, V. L. A.; ALMEIRA, D. O.; SILVA, R. C. F.; SANTOS, L. M. M. *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p.645-648, 2012.

MINHARRO, S.; LINHARES, G. F. C.; ANDRADE, M. A.; ROCHA, P. T.; SANTANA, A. P. 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**, v.2, p.111-117, 2001.

NEWBERRY, L. A.; SKEELES, J. K.; KREIDER, D. L.; BEASLEY, J. N.; STORY, J. D.; MCNEW, R. W.; BERRIDGE, B. R. Use of virulent hemorrhagic enteritis virus for the induction of colibacillosis in turkeys. **Avian Diseases**, v.37, p1-5, 1993.

OIE. World Organization for Animal Health. Mycoplasmosis (*M. gallisepticum*). Paris, [20--?]. Disponível em:  
<[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail)>. Acesso em: 12 outubro. 2013.

PECKHAM, M. C. An outbreak os streptococcosis (apoplectiform septicemia) in white rock chicken. **Avian Diseases**, v.10, p.413-421, 1966.

SANDHU, T. S. Fecal streptococcal infection of commercial white pekin ducklings. **Avian Diseases**, v.32, p.570-573, 1988.

SENTÍES-CUÉ , G.; SHIVAPRASAD, H. L.; CHIN, R. P. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.34, p.137-142, 2005.

SESTERHENN, R.; FERREIRA, T. Z.; KINDLEIN, L.; MORAES, H. L. S. Impacto econômico de condenações *post mortem* de aves sob inspeção estadual no Estado do Rio Grande do Sul. 2011. Disponível em:  
<<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/797.pdf>> Acesso em: 10 fevereiro 2012.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, p.537-549, 2004.

YILMAZ, F.; TIMURKAAN, N.; KILIÇ, A.; KALENDER, H.; KILINÇ, Ü. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chicken by immunohistochemical, PCR and culture methods. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.162, n.2, p.79-86, 2011a.

YILMAZ, F.; TIMURKAAN, N. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antigens by immunohistochemical method in pneumonic broiler chicken lungs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, n.19, p.2557-2560, 2011b.

### 5 ARTIGO 3

Nesse item é apresentado o artigo "**Surto de tifo aviário** (*Salmonella Gallinarum*) **em codornas japonesas** (*Coturnix coturnix japonica*)" que será submetido para publicação na revista *Avian Diseases*.

**Surto de tifo aviário (*Salmonella Gallinarum*) em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*)**

Renata A. Casagrande<sup>A,B</sup>, Angelica T. Barth Wouters<sup>A</sup>, Flademir Wouters<sup>A</sup>, Caroline Pissetti<sup>C</sup>, Marisa R. de Itapema Cardoso<sup>C</sup> and David Driemeier<sup>A,D</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre-RS, 91540-000, Brasil.

<sup>B</sup>Instituto Federal Catarinense, SC-283, Km 8, Vila Fragosos, Concórdia-SC, 89700-000, Brasil.

<sup>C</sup>Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>D</sup>Autor para correspondência: Dr. David Driemeier  
Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brasil.  
Fone: 55 (51) 33086107  
E-mail: davetpat@ufrgs.br

## RESUMO

Tifo aviário (TA), causado por *Salmonella Gallinarum*, apresenta grande importância econômica, devido a altas taxas de mortalidade, morbidade e de queda na produção de ovos. O objetivo deste trabalho é relatar um surto de tifo aviário em codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*). Em um lote de 400 codornas com 42 dias de idade, 222 morreram sem apresentar sinais clínicos ou ficavam prostradas e morriam em poucos minutos. Nas necropsias de cinco aves evidenciou-se fígado aumentado com pontilhado brancoamarelado de distribuição aleatória, baço difusamente pálido com pontilhado brancoamarelado e ocasionais focos de hemorragia e intestino delgado com mucosa avermelhada. Ao exame histopatológico observou-se em fígado e baço necrose multifocal acentuada (5/5), congestão pulmonar com infiltração de macrófagos nos capilares aéreos (5/5), nefrite intersticial discreta (2/2), necrose superficial da mucosa intestinal com grande quantidade de bactérias cocobacilares (2/2), peritonite moderada (2/2) e aerossaculite discreta (1/1). No exame imuno-histoquímico anti-*Salmonella* havia marcação no citoplasma de macrófagos ou livres em fígado (5/5), baço (5/5), pulmões (4/5), rins (2/2), mucosa do intestino delgado (2/2) e do ceco (1/1), medula óssea (1/1), sacos aéreos (1/1) e ovário (1/1). Em coração (5/5), encéfalo (2/2), esôfago (2/2), pâncreas (2/2), proventrículo (2/2), moela (1/1), bursa de Fabricius (1/1), oviduto (1/1) e músculo esquelético (1/1) observou-se marcação apenas no lúmen de vasos sanguíneos. Isolou-se, em cultura pura, *S. Gallinarum* de amostras de fígado, baço, pulmão, intestino e sangue de duas aves. Embora haja poucos relatos de TA em codornas, a enfermidade pode proporcionar grandes perdas econômicas, relacionadas à redução na postura e à mortalidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Salmonelose, doença bacteriana, morte súbita, patologia, ave, poedeira.

## INTRODUÇÃO

Tifo aviário (TA) é uma doença sistêmica grave que acomete as aves, causada por *Salmonella Gallinarum*. Essa enfermidade tem grande importância econômica, por ocasionar altas taxas de mortalidade, morbidade e queda na produção de ovos

(GLOVER & HENDERSON, 1946; JOHNSON *et al.*, 1977; SATO *et al.*, 1997; SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008; EZEMA *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2010; BARROW & FREITAS NETO, 2011). *Salmonella Gallinarum* causa uma doença septicêmica primariamente em galinhas e perus (SHIVAPRASAD, 2000), no entanto, têm sido descritos surtos de TA em outras espécies de aves (AWAAD *et al.*, 1981; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008).

As salmoneloses estão entre as principais doenças aviárias e há monitoria constante na avicultura comercial. No Brasil, os estabelecimentos avícolas de linhagens puras, bisavós e avós devem ser livres para *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Já as matrizes devem ser livres para *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e livres ou controladas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Nos estabelecimentos avícolas produtores de ovos comerciais, de frango de corte, de galinhas de subsistência e de exploração de outras espécies de aves, incluindo a criação de codornas, são realizadas apenas controles eventuais (BRASIL, 2003).

A ausência de monitoria constante nos sistemas de produção de galinhas de subsistência e de outras espécies de aves pode representar uma ameaça à sanidade avícola industrial, uma vez que esses animais podem servir como reservatório desses patógenos, mantendo-os no meio ambiente (PARMAR & DAVIES, 2007; BARROW & FREITAS NETO, 2011).

O tifo aviário tem distribuição mundial, embora muitos países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e vários países da União Europeia são livres de TA há anos (OIE, 2013), no entanto, alguns surtos têm resurgido em países considerados livres (PARMAR & DAVIES, 2007; BARROW & FREITAS NETO, 2011). Em muitos países em desenvolvimento da Ásia e da África essa doença é endêmica (SATO *et al.*, 1997; EZEMA *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2010; BARROW & FREITAS NETO, 2011) e, no Brasil, essa enfermidade ainda apresenta grande importância econômica, com aproximadamente 100 surtos relatados entre 2005 e 2012 (OIE, 2013).

O objetivo deste trabalho é descrever os achados clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos de um surto de tifo aviário em codornas japonesas em início da fase de produção de ovos.

## RELATO DE CASO

Uma propriedade no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, atuava há mais de cinco anos na produção de ovos de codorna e apresentava um plantel de aproximadamente 2.000 codornas. Essas aves eram mantidas em um galpão com sistema de baterias, isto é, com gaiolas em andares separados por bandejas coletoras de fezes. No mesmo galpão eram alojadas aves de diferentes lotes e idades, no entanto, separadas por baterias, sendo esse sistema de produção bastante comum em pequenas propriedades no Brasil.

Uma bateria de 400 codornas em início de postura, com 42 dias de idade, foi adquirida por esse produtor em abril de 2012. Desde a chegada do lote, esse apresentava mortalidade acima do esperado e postura menor que outros lotes da mesma idade. Após sete semanas houve um aumento acentuado da mortalidade, que começou em uma gaiola do andar superior, com 20 aves, depois passou para outra gaiola, do mesmo andar e após disseminou para toda a bateria. A mortalidade perdurou por duas semanas e, ao todo, morreram 222 codornas (55,5%). As aves eram encontradas mortas ou ficavam prostradas, com as penas arrepiadas e morriam poucos minutos após. As codornas das outras baterias, de origem e idades diferentes, não apresentaram quaisquer alterações clínicas e/ou mortalidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se a necropsia de cinco codornas, que morreram durante visita à propriedade. Fragmentos de fígado, baço, coração e pulmões (5/5); encéfalo, medula óssea, rins, esôfago, proventrículo, intestino delgado, pâncreas (2/5); bursa de Fabricius, saco aéreo, ovário, ceco, músculo esquelético (1/5); oviduto, moela e traqueia (1/5) foram colhidos, fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para análise histopatológica e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

Amostras de fígado, baço, pulmão, intestino e sangue de duas aves foram colhidas separadamente, de forma asséptica e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da FAVET/UFRGS. Os fragmentos foram submetidos ao cultivo bacteriano aeróbio em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro e ágar MacConkey. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 24-72 horas.

Realizou-se também a pesquisa de *Salmonella* sp. nas amostras. Utilizou-se para o enriquecimento seletivo o caldo Tetrionato e caldo Rappaport-Vassiliadis, ambos foram incubados a 42°C por 24 horas. Após, as amostras foram plaqueadas em meio ágar XLD e incubadas a 37°C durante 48 horas. A identificação dos isolados foi realizada pela caracterização do perfil bioquímico, pela verificação da presença de citocromo oxidase, produção de urease, fermentação da glicose, sacarose e lactose em meio TSI (triple sugar iron agar), detecção da beta-galactosidase, descarboxilação da lisina, produção de H<sub>2</sub>S, motilidade e produção de indol. Para a confirmação final foi realizada a prova de soroglutinação. As colônias cujas provas bioquímicas completas identificaram *Salmonella* sp. foram enviadas para sorotipagem em laboratório de referência. Realizou-se também antibiograma das colônias isoladas.

Cortes histológicos de todos os órgãos colhidos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para *Salmonella* sp. (SCHAUSER *et al.*, 2004). As amostras foram submetidas à IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizada com a incubação dos cortes dos tecidos numa solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.) em metanol durante 15 minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se protease XIV (Sigma) por 15 minutos, em temperatura ambiente. O bloqueio das reações inespecíficas foi feito com leite desnatado Molico<sup>®</sup> a 5% por 15 minutos, em temperatura ambiente. Utilizou-se anticorpo primário anti-*Salmonella* (Biogenesis<sup>®</sup>) diluído a 1:1000 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 2 horas a 37°C. Após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation<sup>®</sup>) 20 minutos cada etapa. Para a revelação foi utilizado o cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469, DakoCytomation<sup>®</sup>) e, para a contracoloração, a hematoxilina de Mayer, seguida de montagem em meio aquoso (S1964, DakoCytomation). Como controle positivo foi empregado um corte histológico de intestino de suíno com enterocolite por *S. Typhimurium*. Para as diferentes intensidades de marcação foram atribuídos os graus de (-) ausência de marcação, (+) intensidade discreta, (++) intensidade moderada e (+++) intensidade acentuada de marcação.

## RESULTADOS

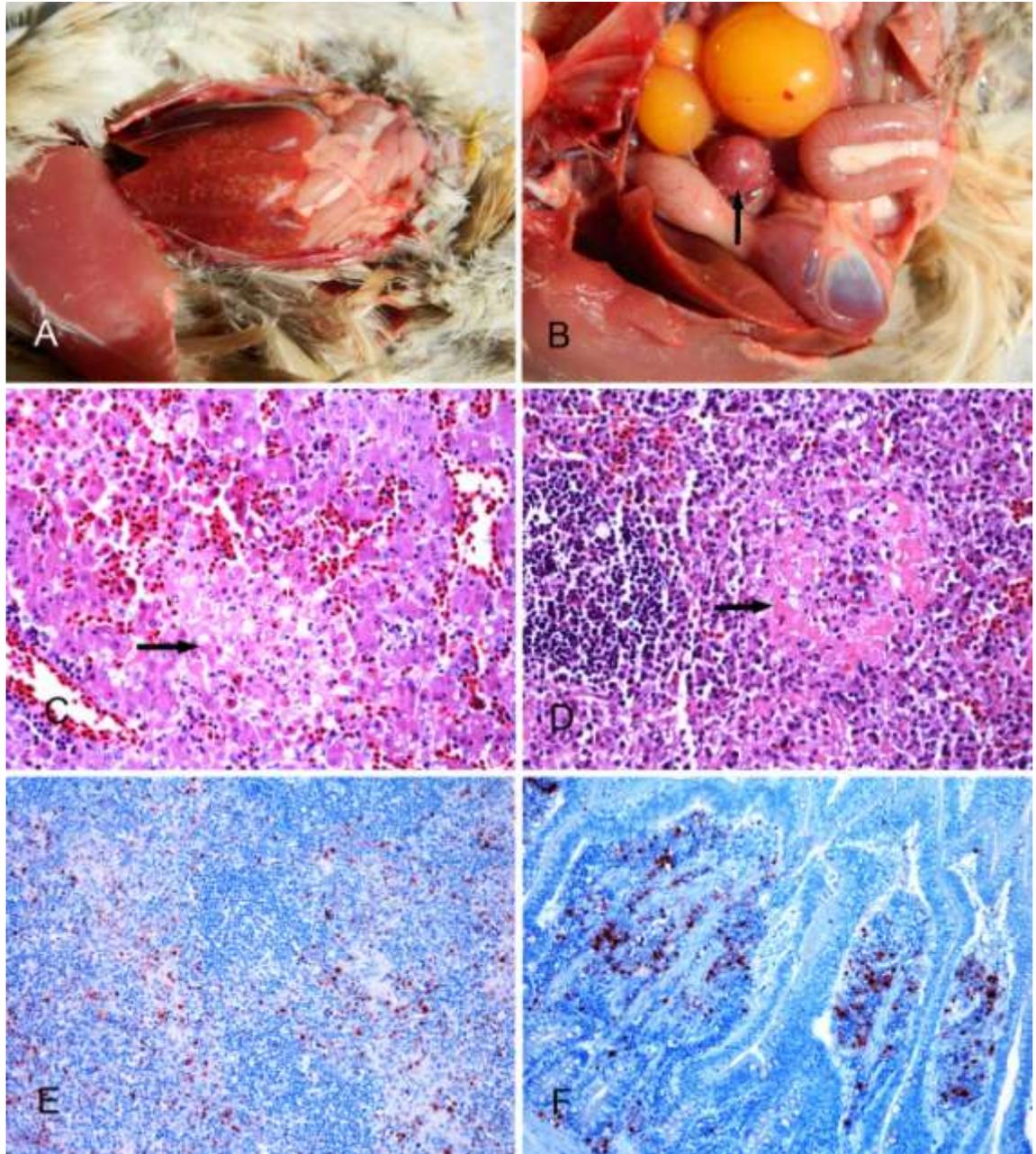
Na necropsia das cinco aves foram observados bom estado corporal, equimoses em tecido subcutâneo da região abdominal e na musculatura das coxas; cavidade celomática com discreto acúmulo de líquido levemente turvo; fígado moderadamente aumentado de volume, vermelho-escuro com pontilhado brancoamarelado de distribuição aleatória (Figura 1A); baço aumentado de volume, difusamente pálido com pontilhado brancoamarelado e ocasionais focos de hemorragia (Figura 1B); e intestino delgado com mucosa avermelhada.

Ao exame histopatológico havia necrose multifocal acentuada em fígado e baço, em alguns focos com aspecto fibrinoide (Figuras 1C e D) (5/5); pulmões moderadamente congestos e moderada quantidade de macrófagos nos capilares aéreos (5/5); rins com infiltrado intersticial multifocal discreto de macrófagos e linfócitos (2/2); intestino delgado com necrose superficial da mucosa associada a hemorragia e grande quantidade de bactérias cocobacilares, aderida à mucosa e no lúmen (2/2); e sacos aéreos com infiltrado multifocal discreto de macrófagos e linfócitos (1/1). O mesotélio da serosa dos intestinos, do ovário e do oviduto estava difusamente reativo e com infiltrado discreto de macrófagos e linfócitos (2/2).

Os achados do exame imuno-histoquímico anti-*Salmonella* encontram-se na Tabela 1. A imunomarcagem era no citoplasma de macrófagos ou livre em áreas de necrose ou sinusoides do fígado (5/5); na polpa vermelha do baço (Figura 1E) (5/5), em capilares aéreos dos pulmões (4/4), lâmina própria da mucosa, lúmen e na superfície dos enterócitos do intestino delgado (2/2) (Figura 1F) e do ceco (1/1), focos de inflamação intersticial dos rins (2/2), sinusoides vasculares da medula óssea (1/1), focos de inflamação dos sacos aéreos (1/1) e no estroma cortical do ovário (1/1). Em todos esses órgãos, também se observou marcação no citoplasma de monócitos ou livre no lúmen de vasos sanguíneos. Em coração (5/5), encéfalo (2/2), esôfago (2/2), pâncreas (2/2), proventrículo (2/2), moela (1/1), bursa de Fabricius (1/1), oviduto (1/1) e músculo esquelético (1/1) observou-se marcação apenas no lúmen de vasos.

Em todos os fragmentos de órgãos e amostras de sangue enviados para isolamento bacteriano e sorotipagem identificou-se, em cultura pura, *Salmonella Gallinarum*. Os resultados de antibiograma demonstraram sensibilidade a sulfa-

trimetoprim, sulfonamida, trimetoprim, gentamicina, enrofloxacin, doxiciclina, ceftiofur e resistência a eritromicina.



**Figura 1.** Tifo aviário em codornas japonesas. **(A)** Fígado discretamente aumentado e com pontilhado brancoamarelado de distribuição aleatória. **(B)** Baço aumentado de volume e com pontilhado brancoamarelado (seta). Necrose fibrinoide em **(C)** fígado (seta) e em **(D)** baço (seta). HE. Obj.40. Imuno-histoquímica anti-*Salmonella*: **(E)** Baço com marcação no citoplasma de macrófagos nas áreas de necrose Obj.20. **(F)** Intestino delgado com marcação no citoplasma de macrófagos na lâmina própria. Estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. Obj.20.

As codornas dessa bateria foram tratadas com sulfa-trimetoprim, por três dias, via água de bebida (dose de 120g do princípio ativo para 1.000 litros de água) e o tratamento foi repetido após uma semana, no entanto, não se observou diminuição da mortalidade. Devido a isso o restante desse lote foi submetido à eutanásia duas semanas após e as gaiolas ocupadas por essas aves foram lavadas, desinfetadas com hipoclorito e colocadas no sol. Após aproximadamente 30 dias as mesmas gaiolas foram repovoadas com um novo lote de codornas, no qual não se observou mortalidade. O vendedor dessa bateria de codornas foi contactado para saber se outros lotes vendidos também apresentaram o mesmo problema, no entanto, essa informação não foi fornecida.

**Tabela 1. Caracterização imuno-histoquímica anti-*Salmonella* dos casos de tifo aviário em codornas**

N <sup>o</sup> Ave	Fígado	Baço	Coração	Pulmão	ID	Rins	Encéfalo	MO	Bursa	Saco aéreo	Esófago	Proventrículo	Moela	Pâncreas	Ceco	Ovário	Oviduto	ME	
1	+++	+++	+++	+++	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
2	+++	+++	+++	+++	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
3	+++	+++	+++	+++	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
4	+++	+++	++	nr	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	nr	++	++	+++	nr	++	++
5	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	nr	nr	nr	+	+	++	++	nr	nr	+	nr	nr

Intensidade de marcação imuno-histoquímica: + = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; nr = imuno-histoquímica não realizada; ID = intestino delgado; MO = medula óssea; ME = músculo esquelético.

## DISCUSSÃO

Embora haja poucos relatos de TA em codornas, nesse estudo observou-se que a enfermidade pode proporcionar grandes perdas econômicas, relacionadas à alta mortalidade e à redução na postura. A cultura de *S. Gallinarum* de diferentes tecidos e sangue somada às lesões e à imunomarcação anti-*Salmonella* em diversos órgãos indicam uma doença septicêmica aguda.

Como foi observado nesse surto, TA pode ser caracterizado por uma doença septicêmica aguda, muitas vezes sem manifestações clínicas, com mortalidade contínua dentro dos lotes ao longo de dias ou semanas (GLOVER & HENDERSON, 1946; JOHNSON et al., 1977; SATO *et al.*, 1997; FREITAS NETO *et al.*, 2007; PARMAR & DAVIES, 2007). Nesse estudo, assim como em outros relatos, mesmo realizando antibioticoterapia a mortalidade não diminui, pois não há medicamento que consiga

eliminar a infecção das aves (JOHNSON *et al.*, 1977; SATO *et al.*, 1997; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008). Em muitos países da Europa e da América do Norte, assim como no Brasil, o tratamento não é preconizado, pois lotes positivos para *S. Gallinarum* devem ser eliminados para que a doença seja erradicada (SHIVAPRASAD & BARROW, 2008).

As lesões macro e microscópicas observadas nesse surto são típicas de TA (JOHNSON *et al.*, 1977; SATO *et al.*, 1997; BERCHIERI JR. *et al.* 2000; SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2001; DESHMUKH *et al.*, 2007; FREITAS NETO *et al.*, 2007; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008) e foram caracterizadas por lesões necróticas em fígado e baço, nefrite, aerossaculite e peritonite. Nesse surto não foram observadas pericardite e miocardite, que também são características dessa enfermidade (SHIVAPRASAD, 2000; DESHMUKH *et al.*, 2007; FREITAS NETO *et al.*, 2007; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008).

O isolamento bacteriano e a sorotipagem foram eficazes na identificação de *S. Gallinarum*. A IHQ anti-*Salmonella* pode ser utilizada como método de diagnóstico de salmonelose em aves, principalmente quando não há material a fresco para isolamento bacteriano, apenas tecidos fixados em formol. No entanto, através dessa técnica não é possível determinar o sorotipo envolvido (SCHAUSER *et al.*, 2004).

Muitos fatores podem facilitar a infecção por *S. Gallinarum* nas aves. Nesse surto não foi possível determinar como as codornas se infectaram, embora haja suspeita de que as aves já chegaram infectadas na propriedade, pois as aves das outras baterias não adoeceram. Possivelmente essas aves albergavam a bactéria e manifestaram a doença em decorrência de estresse inerente ao transporte, ao novo ambiente e ao início da postura.

A ingestão de fezes contaminadas por *S. Gallinarum* é a principal forma de transmissão do TA (BARROW *et al.*, 1999; BERCHIERI JR. *et al.* 2000). No presente relato isolou-se essa bactéria do intestino e a mesma foi também evidenciada na IHQ, o que sugere a possibilidade dessa via de contaminação entre as aves. Portanto, como as aves dos diferentes lotes eram alojadas em baterias distintas, isso pode ter evitado o contato das fezes entre as mesmas e a disseminação da doença para as demais aves alojadas no galpão. No entanto, para confirmar essa hipótese, deveria ter sido realizada a pesquisa de *Salmonella* nas fezes dos demais lotes.

*Salmonella Gallinarum* pode causar infecção persistente nas aves, com transmissão vertical (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD & BARROW, 2008; BARROW & FREITAS NETO, 2011), no entanto, em alguns estudos experimentais não se conseguiu isolar a bactéria dos ovos provenientes de matrizes infectadas (BERCHIERI JR. *et al.* 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2001). Como já foi relatado em galinhas, *S. Gallinarum* pode ser isolada do ovário e do oviduto (SHIVAPRASAD, 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2001). No presente relato a presença da bactéria nesses órgãos do sistema reprodutor foi confirmada através da IHQ anti-*Salmonella*.

Nesse surto a transmissão vertical foi uma possível fonte inicial de infecção que, após essas codornas estarem infectadas, eliminaram o agente nas fezes, transmitindo às outras aves da mesma bateria. Para confirmar essa hipótese seria importante saber se outros lotes procedentes das mesmas matrizes também tiveram TA, no entanto, não se conseguiu obter essa informação junto ao fornecedor das aves.

Outro fator relevante é a variação na suscetibilidade ao TA entre as diferentes espécies de aves (SHIVAPRASAD & BARROW, 2008; BARROW *et al.*, 1999) e também há variação dentro da mesma espécie (BUMSTEAD & BARROW, 1993; BERCHIERI JR. *et al.* 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2001; ALVAREZ *et al.*, 2003, FREITAS NETO *et al.*, 2007). Em galinhas, há estudos que comprovam que galinhas caipiras são mais resistentes ao TA que galinhas de linhagens comerciais (ALVAREZ *et al.*, 2003). Há também estudos que apontam haver variação genética de suscetibilidade entre as diferentes linhagens comerciais (BUMSTEAD & BARROW, 1993; BERCHIERI JR. *et al.* 2000; BERCHIERI JR. *et al.* 2001; FREITAS NETO *et al.*, 2007). Em codornas existem poucos estudos que apontem a suscetibilidade dessa espécie a *S. Gallinarum* (DESHMUKH *et al.*, 2005; 2007). Nesse estudo observou-se que codornas jovens podem ser altamente suscetíveis ao TA, apresentando um quadro agudo, com mortalidade elevada.

Conclui-se que TA é uma importante enfermidade para codornas. Sendo assim, deve se dar maior atenção à monitoria da salmonelose em plantéis comerciais de codornas, otimizando diagnóstico e controle.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M. T.; LEDESMA, N.; TÉLLEZ, G.; MOLINARI, J.L.; TATO P. Comparison of the immune responses against *Salmonella* enterica serovar Gallinarum infection between naked neck chickens and a commercial chicken line. **Avian Pathology**, v.32, p.193-203, 2003.
- AWAAD, M. H.; HAFEZ, H. M.; EL-DIMERDASH, M. Z.; KRAUSS, H. Some epidemiological aspects of *Salmonella* Gallinarum infection in Japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*). **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v.28 p.704-12, 1981.
- BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; MURPHY, C. K.; PAGE, K. Salmonella infection in a commercial line of ducks; Experimental studies on virulence, intestinal colonization and immune protection. **Epidemiology & Infection**, v.123, p.121–132, 1999.
- BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v.40, p.1-13, 2011.
- BERCHIERI JR., A.; OLIVIERA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.50– 52, 2000.
- BERCHIERI JR., A.; MURPHY, A.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella* enterica sorovars Gallinarum and Pullorum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, v.30, p.221–231, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003. aprova as normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 3-5, de 05 de novembro de 2003, Seção I.
- BUMSTEAD, N.; BARROW, P.A. Resistance to *Salmonella* Gallinarum, *S.* Pullorum and *S.* Enteritidis in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, v.37, p.189–193, 1993.
- DESHMUKH, S.; ASRANI, R. K.; LEDOUX, D. R.; JINDAL, N.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E.; SHARMA, M.; SINGH; S. P. Individual and combined effects of *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, and *Salmonella* Gallinarum infection on liver of Japanese quail. **Avian Diseases**, v.49, p.592-600, 2005.
- DESHMUKH, S.; ASRANI, R. K.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; GUPTA, V.K. Pathologic changes in extrahepatic organs and agglutinin response to *Salmonella* Gallinarum infection in Japanese quail fed *Fusarium verticillioides* culture material containing known levels of fumonisin B1. **Avian Diseases**, v.51, p705-712, 2007.

EZEMA, W. S.; ONUOHA, E.; CHAH K. F. Observations on an outbreak of fowl typhoid in commercial laying birds in Udi, South Eastern Nigeria. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, p.395-398, 2009.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI, A. Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, p.133-141, 2007.

GAST, R. K. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 619.

GLOVER, J. S.; HENDERSON, W. Fowl Typhoid: Report of a recent outbreak in Ontario. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.10, p.241-249, 1946.

JOHNSON, D. C.; KEENUM, K. G.; PERRY, H. P. A fowl typhoid outbreak in a chicken breeder flock. **Avian Diseases**, v.21, p.716-719, 1977.

Kwon, Y. K.; Kim, A.; Kang, M. S.; Her, M.; Jung, B. Y.; Lee, K. M.; Jeong, W.; An, B. K.; Kwon, J. H. Prevalence and characterization of *Salmonella* Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. **Poultry Science**, v.89, p.236-242, 2010.

OIE. (2013). World Animal Health Information Database (WAHID). Fowl typhoid. Available online at [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail).

PARMAR, D.; DAVIES, R. Fowl typhoid in a small backyard laying flock. **Veterinary Record**, v.160, p.348, 2007.

SATO, Y.; SATO, G.; TUCHILI, L.; PANDEY, G. S.; NAKAJIMA, A.; CHIMANA, H.; SINSUNGWE, H. Status of *Salmonella* gallinarum-pullorum infections in poultry in Zambia. **Avian Diseases**, v.41, p.490-495, 1997.

SCHAUSER, K.; OLSEN, J. E.; LARSSON, L. I. Immunocytochemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.691-695, 2004.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Scientific and Technical Review**, v.19, p.405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and Fowl Typhoid. In: SAIF, Y. M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, p. 620-636.

## **6 ARTIGO 4**

Nesse item é apresentado o artigo "**Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos**" que foi submetido para publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

## Trabalho 3393 WM

## Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos<sup>3</sup>

Renata A. Casagrande<sup>4,5</sup>, Veronica R. Machado<sup>4</sup>, Suyene O. de Souza<sup>4</sup>, Tatiane T. N. Watanabe<sup>4</sup>,  
Luciana Sonne<sup>4</sup>, Saulo P. Pavarini<sup>4</sup> e David Driemeier<sup>4\*</sup>

**ABSTRACT.**- Casagrande R.A., Machado V.R., de Souza S.O., Watanabe T.T.N., Sonne L., Pavarini S.P. & Driemeier D. 2013. [**Immunohistochemical diagnosis and pathological characterization of chlamydiosis in psittacine.**] Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

The chlamydiosis is caused by *Chlamydophila psittaci* and it is one of the most important avian zoonosis. A retrospective study in psittacines was performed from 1995 to 2012, and immunohistochemistry (IHC) anti-*Chlamydia*. One hundred eleven cases were evaluated and twelve died due to chlamydiosis. The birds were illegal trafficking or captive (zoos, breeding birds, wildlife rehabilitation center and pets). Grossly was observed hepatomegaly (4/12) with yellowish-white areas (3/12), splenomegaly (2/12) splenic rupture (1/12), fibrin deposition in pericardial sac (1/12), fibrinous polyserositis (1/12) and in three cases there was no lesion. In the histopathological evaluation was seen mononuclear necrotizing hepatitis (7/12), mononuclear hepatitis (3/12), biliary duct hyperplasia (8/12), histiocytic necrotizing splenitis (9/12), hemosiderosis in liver (9/12) and spleen (9/12), mononuclear aerosaculitis (4/12), fibrin heterophilic pericarditis (2/12), lymphoid necrosis (1/12) and depletion (1/12) of bursa of *Fabricius*, fibrinous pneumonia (1/12), mononuclear nephritis (1/12) and renal granulomas (1/12). Basophilic intracytoplasmic inclusions (elementary bodies) were observed in liver (2/12), spleen and kidney (1/12). Immunostaining for *Chlamydia* could be detected in liver (11/12), spleen (7/9), lung (3/9), kidney (2/8), intestines (2/3), air sacs (1/4) and bursa of *Fabricius* (1/2). IHC can be used as *post mortem* definitive diagnosis of chlamydiosis in psittacines in Brazil.

INDEX TERMS: Zoonosis, bird, pathology, psittacosis, *Chlamydophila psittaci*.

**RESUMO.**- A clamidiose é causada por *Chlamydophila psittaci* e representa uma das principais zoonoses de origem aviária. Realizou-se um estudo retrospectivo em psitacídeos do período de 1995 a 2012 e exame imuno-histoquímico (IHQ) anti-*Chlamydia*. Avaliou-se 111 casos e 12 morreram devido a clamidiose. As aves eram provenientes de apreensão ou cativeiro (zoológicos, criatórios, centros de triagem e domicílios). À necropsia observou-se fígado aumentado (4/12) com áreas branco-amareladas (3/12), baço aumentado (2/12) e rompido (1/12), saco pericárdico com deposição de fibrina (1/12), polisserosite fibrinosa (1/12) e em três casos não havia lesões. Na avaliação histopatológica evidenciou-se hepatite necrótica mononuclear (7/12), hepatite mononuclear (3/12), hiperplasia de ductos biliares (8/12), esplenite necrótica histiocitária (9/12), hemossiderose em fígado (9/12) e baço (9/12), aerossaculite mononuclear (4/12), pericardite fibrino-heterofílica (2/12), necrose (1/12) e rarefação (1/12) linfóide de bursa de *Fabricius*, pneumonia fibrinosa (1/12), nefrite mononuclear (1/12) e granulomas renais (1/12). Observaram-se inclusões basofílicas intracitoplasmáticas (corpos elementares) em fígado (2/12), baço e rins (1/12). Evidenciou-se imunomarcagem anti-*Chlamydia* em fígado (11/12), baço (7/9), pulmões (3/9), rins (2/8), intestinos (2/3), sacos aéreos (1/4) e bursa de *Fabricius* (1/2). A IHQ poderá ser utilizada como forma de diagnóstico definitivo *post mortem* de clamidiose em psitacídeos no Brasil.

<sup>3</sup>Recebido em 18 de agosto de 2013.

Aceito para publicação em .....

<sup>4</sup>Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>5</sup>Instituto Federal Catarinense, SC-283, Km 8, Vila Fragosos, Concórdia, SC 89700-000, Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Zoonose, ave, patologia, psitacose, *Chlamydophila psittaci*.

## INTRODUÇÃO

A clamidiose, uma enfermidade infecciosa de aves e mamíferos, é causada pela bactéria intracelular obrigatória *Chlamydophila psittaci*. Esse agente já foi detectado em mais de 460 espécies de aves e os psitacídeos são os mais acometidos (Kaleta & Taday 2003). Em humanos *C. psittaci* causa a psitacose, uma das principais zoonoses de origem aviária (Heddema et al. 2006, Vanrompay et al. 2007, Petrovay & Balla 2008, Harkinezhad et al. 2009, Raso et al. 2010).

As aves podem desenvolver uma forma aguda, subaguda, crônica e inaparente (subclínica) da doença, dependendo do estado imunológico e da patogenicidade da bactéria (Andersen & Vanrompay 2008). Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem anorexia, depressão, penas eriçadas, conjuntivite, sinusite, rinite, dispneia, diarreia, poliúria, tremores e convulsões (Gerlach 1994, Andersen & Vanrompay 2008). A forma mais comum é a subclínica, na qual as aves são portadoras e a eliminação do agente é intermitente (Proença et al. 2011).

No Brasil os relatos de clamidiose em aves são escassos. Um surto foi descrito em 58 papagaios apreendidos do tráfico com mortalidade de 96,5% (Raso et al. 2004) e um outro em 15 psitacídeos em um Centro de Triagem de Animais Silvestres (Ecco et al. 2009). Em um estudo a detecção de *C. psittaci* em psitacídeos de cativeiro, aparentemente saudáveis, variou entre 16,7 a 56,1% (Raso et al. 2002) e em psitacídeos de vida livre entre 6,3 a 26,7% (Raso et al. 2006). Além das aves selvagens, essa enfermidade também é considerada bastante importante em aves de produção, podendo causar graves problemas respiratórios e alta mortalidade, principalmente em criações de perus (Van Loock et al. 2006).

A clamidiose possui prevalência subestimada devido à ausência de sinais clínicos patognômicos, pelo dificuldade de se ter um diagnóstico definitivo e pela ausência de testes comerciais padronizados (Proença et al. 2011). No entanto, um diagnóstico rápido e acurado é necessário, devido à alta mortalidade que pode ocorrer nas aves (Raso et al. 2004) e ao seu potencial zoonótico (Longbottom & Coulter 2003). Dentre os diferentes métodos de diagnóstico, a imuno-histoquímica (IHQ) é considerada o método *post mortem* mais acurado para tecidos fixados em formol (Elder & Brown 1999, Ecco et al. 2009).

O objetivo deste trabalho foi descrever, através de um estudo retrospectivo, as características anatomopatológicas, bem como realizar IHQ anti-*Chlamydia* de casos suspeitos de clamidiose em psitacídeos enviados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no período de 1995 a 2012.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os arquivos de necropsia e exame histopatológico de psitacídeos foram levantados e revisados do período de 1995 a 2012 do SPV-UFRGS. Dados referentes às aves foram registrados, agrupados e analisados. Realizou-se a busca dos blocos de parafina e posteriormente os cortes e coloração pelo método de hematoxina e eosina (HE) para caracterização histológica das lesões.

Nos casos em que havia amostra de fígado, os fragmentos de todos os órgãos foram submetidos à técnica de IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos em solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.) em metanol. Para a recuperação antigênica utilizou-se proteinase K (DakoCytomation) em temperatura ambiente por sete minutos. O anticorpo monoclonal anti-*Chlamydia* (clone ACI, 10R-C124A, Fitzgerald) foi diluído em 1:100 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 14-16 horas (*overnight*) a 4°C como o anticorpo primário e, após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation). O cromógeno utilizado para a revelação foi o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469, DakoCytomation) e foi utilizada hematoxilina de Mayer na contracoloração, seguida de montagem em meio aquoso (S1964, DakoCytomation). Como controle positivo utilizou-se um corte histológico de fígado de um psitacídeo com marcação IHQ positiva para *Chlamydia* proveniente da Universidade da Georgia, Estados Unidos (UGA, USA).

Para as diferentes intensidades de marcação foram atribuídos os graus de (-) ausência de marcação, (+) intensidade discreta, (++) intensidade moderada e (+++) intensidade acentuada.

## RESULTADOS

No período de 1995 a 2012, foram realizados 128 diagnósticos histopatológicos de amostras de psitacídeos, em 111 casos realizou-se IHQ anti-*Chlamydia* e em 16 houve marcação. As características e manifestações clínicas desses psitacídeos encontram-se no Quadro 1. Todas as aves positivas para a IHQ anti-*Chlamydia* eram provenientes do estado do Rio Grande do Sul.

Quanto à origem, seis aves (casos 4 a 9) eram de uma apreensão de aproximadamente 450 caturritas (*Myiopsitta monachus*) efetuada pela Polícia Ambiental do Rio Grande do Sul (Surto 1). Após a apreensão as aves foram encaminhadas para zoológicos, hospitais e clínicas veterinárias e nesses locais várias pessoas auxiliaram no cuidado das aves, pois muitas eram filhotes e não se alimentavam sozinhas. Alguns dias após, aproximadamente 25 pessoas apresentaram náuseas, dores de cabeça e no corpo, febre e tiveram diagnóstico de psitacose. Algumas caturritas apresentavam sinais clínicos inespecíficos (Quadro 1), no entanto, a maioria estava aparentemente saudável. Todas as aves foram submetidas à eutanásia, 14 foram enviadas para necropsia, e dessas seis foram positivas na IHQ.

O segundo surto foi diagnosticado em um zoológico, no qual três psitacídeos morreram em uma semana (casos 11, 12 e 13). Os outros seis casos (1 a 3, 10, 14 e 15) ocorreram de forma isolada e as aves eram provenientes de centros de triagem e cativeiros domiciliares (Quadro 1). O caso 16 era proveniente de um criatório de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) com plantel de 50 casais. Nos últimos meses havia morrido aproximadamente 50 filhotes entre 15 a 90 dias de idade. Desses animais mortos, seis foram encaminhados para necropsia e apenas um (caso 16) apresentou clamidiose. O proprietário, que tinha contato bastante próximo com os animais, estava com quadro de doença respiratória crônica intermitente não responsiva ao tratamento com antibióticos há mais de dois meses.

De acordo com os achados anatomopatológicos e de IHQ, 12 aves morreram devido à clamidiose (casos 1, 4, 5, 7 a 14 e 16). As outras quatro apresentavam IHQ positiva para *Chlamydia* nas células de *Kupffer* do fígado, no entanto, não se observou lesões compatíveis com clamidiose. Essas aves morreram devido à: septicemia bacteriana (caso 2), endocardite bacteriana (caso 3) e aspergilose (casos 6 e 15).

As alterações observadas na necropsia dos psitacídeos com clamidiose foram: fígado aumentado (4/12) e com áreas brancomareladas (3/12) (Fig.1), baço aumentado (2/12) e rompido (1/12), saco pericárdico com deposição de fibrina (1/12) e órgãos da cavidade celomática recobertos por fibrina (1/12). Em três casos não havia lesões macroscópicas significativas.



Fig.1. Clamidiose em psitacídeos. Fígado aumentado e com áreas amareladas.

**Quadro 1. Caracterização e manifestações clínicas dos psitacídeos acometidos por clamidiose**

Caso	Ano	Origem	Espécie	Idade	Manifestações clínicas
1	2007	Centro de triagem	Caturrita ( <i>Myiopsitta monachus</i> )	NI	NI
2	2007	Centro de triagem	Papagaio ( <i>Amazona</i> sp)	NI	NI
3	2007	Domiciliar	Arara-canindé ( <i>Ara ararauna</i> )	35 anos	Encontrado morto
4 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
5 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
6 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
7 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
8 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
9 <sup>I</sup>	2007	Apreensão	Caturrita	Filhote	Prostração, hiporexia
10	2008	Domiciliar	Calopsita ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )	2 meses	Encontrado morto
11 <sup>II</sup>	2009	Zoológico	Papagaio-do-mangue ( <i>Amazona amazonica</i> )	Adulto	Prostração, dispneia
12 <sup>II</sup>	2009	Zoológico	Arara-vermelha ( <i>Ara chloropterus</i> )	Adulto	Encontrado morto
13 <sup>II</sup>	2009	Zoológico	Arara-canindé	Adulto	Prostração
14	2011	Domiciliar	Papagaio-verdadeiro ( <i>Amazona aestiva</i> )	4 meses	Encontrado morto
15	2011	Centro de triagem	Papagaio-verdadeiro	NI	NI
16	2012	Criatório comercial	Calopsita	3 meses	Anorexia, emagrecimento, secreção nasal, diarreia

<sup>I</sup> = primeiro surto; <sup>II</sup> = segundo surto; NI = dado não informado.

Na avaliação histopatológica as principais lesões encontravam-se no fígado e eram caracterizadas por infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos predominantemente na região portal (10/12) com necrose de coagulação ou fibrinoide multifocal (7/12) (Fig.2A), hiperplasia de ductos biliares (8/12) e acúmulo de hemossiderina no citoplasma de macrófagos na região portal ou próximo as áreas de necrose (9/12). No baço observou-se necrose fibrinoide associado a infiltrado de macrófagos e depleção linfóide (9/12) com hemossiderose (9/12). Outros achados observados foram: sacos aéreos com infiltrado predominante de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (4/12); coração com deposição de fibrina acompanhado de infiltrado predominante de heterófilos no epicárdio (2/12); bursa de *Fabricius* com rarefação (1/12) ou necrose (1/12) linfóide; rins com necrose fibrinoide multifocal circundada por infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (1/12) ou múltiplos granulomas compostos por centros de necrose fibrinoide circundada por células gigantes multinucleadas (1/12) e nos pulmões deposição de fibrina com infiltrado de macrófagos no lúmen de parabrônquios (1/12). Observaram-se ainda inclusões basofílicas intracitoplasmáticas (corpos elementares) em hepatócitos (2/12) (Fig.2B), e em macrófagos no baço e nos rins (1/12).

Os resultados da IHQ anti-*Chlamydia* estão apresentados no Quadro 2. Observou-se marcação no citoplasma de macrófagos nas áreas de inflamação e/ou necrose em fígado (15/16) (Fig.2C), baço (7/11) (Fig.2D), pulmões (3/11), rins (2/10), intestinos (2/4), sacos aéreos (1/4) (Fig.2E) e bursa de *Fabricius* (1/2). Em um caso que a ave apresentava polisserosite e granulomas renais, a marcação foi evidenciada apenas nos rins em citoplasma de macrófagos ou em áreas centrais de necrose dos granulomas (Fig.2F). No entanto, esse foi o único animal enviado congelado para necropsia, os demais eram refrigerados.

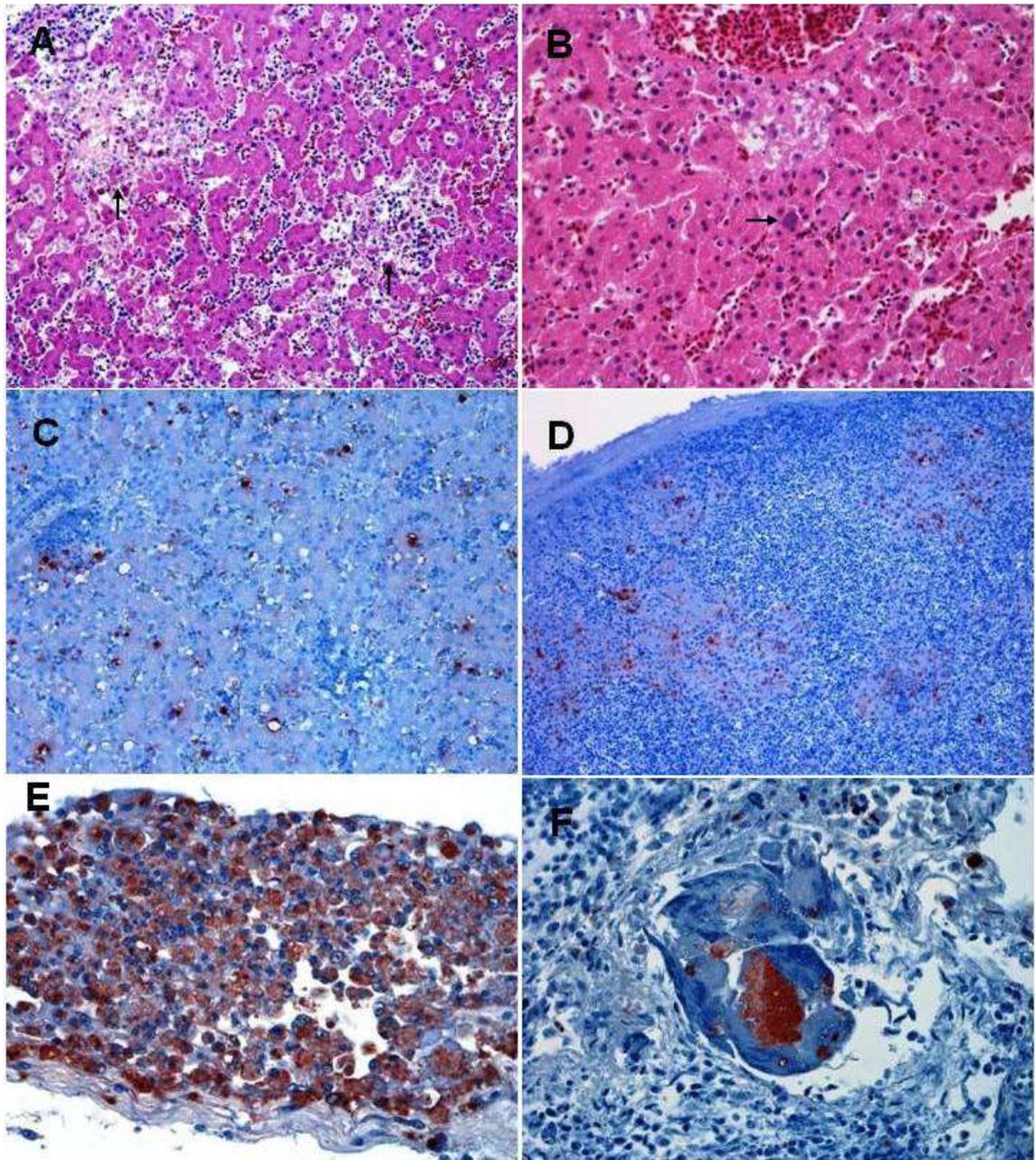


Fig.2. Clamidiose em psitacídeos. **(A)** Hepatite necrótica mononuclear (setas). HE, obj.20. **(B)** Fígado com inclusão basofílica intracitoplasmática (corpo elementar) em hepatócito (seta). HE. obj.40. Imuno-histoquímica anti-*Chlamydia*: marcação positiva em **(C)** fígado, **(D)** baço, **(E)** sacos aéreos e **(F)** rins. Método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. obj.20. (C e D), obj.40. (E e F).

**Quadro 2. Distribuição e intensidade da marcação de imuno-histoquímica anti-*Chlamydia* nos casos de clamidiose em psitacídeos**

Caso	Fígado	Baço	Pulmões	Sacos aéreos	Coração	Rins	Bursa de Fabricius	Intestinos
1	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2*	+	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR
3*	++	-	NR	NR	NR	-	NR	-
4	+	NR	-	NR	-	-	NR	NR
5	+	-	-	NR	-	-	NR	NR
6*	+	-	-	NR	-	NR	NR	NR
7	+	+++	-	NR	NR	-	NR	NR
8	+++	+++	NR	NR	-	NR	+++	NR
9	+	+++	-	NR	-	-	NR	NR
10	++	+	++	NR	-	NR	NR	NR
11	+++	+++	+++	+++	NR	+++	NR	+++
12	+++	+++	-	-	NR	-	NR	+++
13	+++	+++	NR	-	NR	NR	NR	-
14	-	-	-	-	-	+++	NR	NR
15*	+	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR
16	++	NR	+	NR	-	-	-	NR

NR = não realizado; Intensidade de marcação (IHQ): - = negativa; + = discreta; ++ = moderada; +++ = acentuada; \*aves apenas com marcação nas células de *Kupffer*.

## DISCUSSÃO

Nesse estudo a clamidiose foi observada em diferentes espécies de psitacídeos e os filhotes foram os mais afetados. A caturrita foi a espécie com maior número de casos. Essa espécie é comumente criada como ave de estimação no Estado do Rio Grande do Sul. A maioria dos animais acometidos eram provenientes do tráfico ilegal de animal (apreensão ou centro de triagem), o que demonstra que situações de estresse, deficiência nutricional e imunossupressão são fatores predisponentes para que aves portadores desenvolvam clamidiose (Proença et al. 2011).

Essa enfermidade é a principal zoonose transmitida por psitacídeos e pode causar doença fatal em humanos (Petrovay & Balla 2008, Proença et al. 2011). A clamidiose é considerada uma importante doença ocupacional e vários estudos apontam sorologia positiva em funcionários de zoológicos e criatórios de aves (Heddema et al. 2006, Vanrompay et al. 2007, Harkinezhad et al. 2009, Raso et al. 2010). Nesse trabalho várias pessoas que entraram em contato com as caturritas, adoeceram. Heddema et al. (2006) descrevem um surto de psitacose em humanos num hospital veterinário e Raso et al. (2010) também relatam casos em funcionários de zoológicos.

No Brasil, trabalhos pioneiros demonstraram a infecção por *C. psittaci* em psitacídeos por sorologia, imunofluorescência direta e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Raso et al. 2002, 2004, 2006). Na clamidiose as manifestações clínicas e as lesões macroscópicas são inespecíficas, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico (Gerlach 1994, Raso et al. 2004, Ecco et al. 2009). Através da avaliação anatomopatológica observou-se que as lesões mais significativas encontram-se no fígado, como observado em outros trabalhos (Ecco et al. 2009). Em baço, pulmões, coração, sacos aéreos, rins e bursa de *Fabricius* também podem ser evidenciadas lesões. Dependendo da forma clínica da doença (aguda, subaguda ou crônica) as lesões podem variar. Na forma aguda é comum observar hepatomegalia, peritonite fibrinosa, aerssaculite, pericardite, peri-hepatite, pneumonia, enterite e nefrite (Gerlach 1994). Nesse estudo 11/12 aves apresentaram lesões características da forma aguda da doença.

No exame histopatológico, as únicas estruturas específicas das clamídias são os corpos elementares, que muitas vezes não são visualizados. Nesse trabalho, em apenas duas aves observaram-se essas estruturas e, em outros estudos semelhantes, os corpos elementares foram identificados em sete de 13 casos (Elder & Brown 1999) e em dois de 15 (Ecco et al. 2009). Assim como nesse estudo, a principal lesão histológica da clamidiose é hepatite mononuclear podendo ter áreas de necrose, hiperplasia de ductos biliares e hemossiderose (Abdul-Aziz et al. 2008, Ecco et al. 2009).

Em casos crônicos da doença observa-se granulomas em fígado e pulmões (Gerlach 1994). Em surtos de clamidiose em psitacídeos observaram-se granulomas hepáticos em 5/10 (Raso et al. 2004) e em 6/15 aves (Ecco et al. 2009). No presente estudo, dos 12 casos, apenas um tinha lesões compatíveis com a forma crônica da doença. No entanto, nesse caso os granulomas foram observados apenas nos rins com imunomarcção anti-*Chlamydia* nos centros necróticos. A visualização das lesões, bem como a imunomarcção em fígado e baço foram prejudicados pelo processo de congelamento que essa ave foi submetida.

O isolamento e identificação de *C. psittaci* é considerado o teste de referência para o diagnóstico de clamidiose, no entanto essa técnica é pouco utilizada. Por ser uma bactéria intracelular obrigatória, necessita um correto armazenamento das amostras e precisa ser cultivada em ovos embrionados ou linhagens celulares, em laboratórios com alto nível de biossegurança, o que dificulta a realização do procedimento na rotina de diagnóstico (Vanrompay et al. 1992, Sachse et al. 2009, Proença et al. 2011). Devido a dificuldade na cultura e isolamento dessa bactéria, a PCR, a imunofluorescência direta e os exames sorológicos são as principais técnicas utilizadas no diagnóstico (Vanrompay et al. 1992, Vanrompay et al. 1994, Raso et al. 2002, 2004, 2006, Verminnen et al. 2006). A PCR é o único método de diagnóstico comercial disponível no país (Proença et al. 2011). Esses métodos são rápidos e altamente confiáveis, no entanto não diferenciam as aves portadoras de doentes. A IHQ é considerada a forma de diagnóstico *post mortem* mais acurada para a clamidiose e é amplamente utilizada como exame de rotina em laboratórios de patologia em países como os Estados Unidos (Elder & Brown 1999). Os principais órgãos de eleição para o diagnóstico de clamidiose por IHQ são fígado e baço (Elder & Brown 1999, Ecco et al. 2009), sendo que nesse estudo 11 aves apresentavam marcação no fígado e sete no baço (7/9). Nesse trabalho quatro aves morreram devido a infecção causada por outros agentes etiológicos e apresentaram marcação na IHQ para *Chlamydia* em células de *Kupffer*. Sendo assim, através da IHQ pode-se determinar se a bactéria estava relacionada a lesão (imunomarcção) e causou a morte da ave ou se a imunomarcção estava apenas em macrófagos residuais do fígado determinando o estado de portador.

Apesar da IHQ ser um técnica bastante confiável, alguns cuidados devem ser tomados para que não haja resultados falsos. Apenas seis das 14 caturritas do surto de clamidiose apresentaram imunomarcção anti-*Chlamydia*. Isso pode ter ocorrido, pois como todos os animais apreendidos foram submetidos à eutanásia, alguns poderiam ser negativos. No entanto, em estudos retrospectivos falhas no processamento dos tecidos podem ocorrer com maior frequência. O formaldeído de baixa qualidade e a permanência desses tecidos por longo tempo nesse fixador pode mascarar os epítomos e alterar a habilidade dos anticorpos em reconhecer os antígenos presentes (Webster et al. 2009). Nos casos de clamidiose a interpretação da marcação também é outro ponto bastante crítico. A utilização de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno pode criar problemas na interpretação em casos de lesões hepáticas e esplênicas causadas pela *C. psittaci*, pois é difícil diferenciar imunomarcção marrom de pigmento férrico e biliar (Elder & Brown 1999). Para minimizar esse problema, no presente trabalho utilizou-se o cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) que tem cor vermelha e pode ser facilmente diferenciado desses pigmentos.

Através desse trabalho conclui-se que a clamidiose é uma doença frequente em psitacídeos no Rio Grande do Sul e o histórico clínico e as lesões anatomopatológicas associadas à identificação do agente são fundamentais para o diagnóstico definitivo de clamidiose. A IHQ foi o método de diagnóstico confirmatório utilizado no presente estudo e poderá ser empregada como método de diagnóstico definitivo *post mortem* de clamidiose em psitacídeos no Brasil.

**Agradecimentos.-** À Professora Elisabeth Howerth do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Georgia, Estados Unidos, por nos ceder gentilmente o controle positivo de *Chlamydia* para realização da IHQ. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Abdul-Aziz T., Fletcher O. & Barnes H.J. 2008. Hepatobiliary system, p.202-237. In: Fletcher O.J. (Ed), Avian histopathology. Omni press, Madison.
- Andersen A.A. & Vanrompay D. 2008. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis), p.971-986. In: Saif Y.M. (Ed.), Diseases of Poultry. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell, Iowa.

- Ecco R, Preis I.S., Martins N.R.S., Vilela D.A.R. & Shivaprasad H.L. 2009. An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. *Braz. J. Vet. Pathol.* 2(2):85-90.
- Elder J. & Brown C. 1999. Review of techniques for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in psittacine birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:539-541.
- Gerlach H. 1994. Chlamydia, p.984-996. In: Richie B.W., Harrison G.J. & Harrison L.R. (Eds), *Avian medicine: principles and application*. Wingers, Florida.
- Harkinezhad T., Verminnen K., De Buyzere M., Rietzschel E., Bekaert S. & Vanrompay D. 2009. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. *J. Med. Microbiol.* 58:1207-1212.
- Heddema E.R., Van Hannen E.J., Duim B., De Jongh B.M., Kaan J.A., Van Kessel R., Lumeij J.T., Visser C.E. & Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. 2006. An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* 55:1571-1575.
- Kaleta E.F. & Taday M.A. 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32:435-462.
- Longbottom D. & Coulter L.J. 2003. Animal chlamydiosis and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128:217-244.
- Petrovay F. & Balla E. 2008. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. *J. Med. Microbiol.* 57:1296-1298.
- Proença L.M., Fagliari J.J. & Raso T.F. 2011. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Cienc. Rural* 41:841-847.
- Raso T.F., Berchieri Jr.A. & Pinto A.A. 2002. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* 32:118-121.
- Raso T.F., Godoy S.N., Milanelo L., De Souza C.A.I., Matuschima E.R., Araújo J.P. & Pinto A.A. 2004. An outbreak of chlamydiosis in captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* 35:94-96.
- Raso T.F., Seixas G.H.F., Guedes N.M.R. & Pinto A.A. 2006. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet. Microbiol.* 117:235-241.
- Raso T.F., Carrasco A.O.T., Silva J.C.R., Marvulo M.F.V. & Pinto A.A. 2010. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. *Zoonoses Public Hlth.* 57:411-416.
- Sachse K. Vretou E., Livingstone M., Borel N., Pospischil A. & Longbottom D. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet. Microbiol.* 135:2-21.
- Van Loock M., Loots K., Van Heerden M., Vanrompay D. & Goddeeris B.M. 2006. Exacerbation of *Chlamydophila psittaci* pathogenicity in turkeys superinfected by *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 37:745-755.
- Vanrompay D., Ducatelle R. & Haesebrouck F. 1992. Diagnosis of avian chlamydiosis: specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cellcultures. *Zentralbl. Veterinarmed B.* 39:105-112.
- Vanrompay D., Van Neron A., Ducatelle R. & Haesebrouck F. 1994. Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J. Clin. Microbiol.* 32:1470-1474.
- Vanrompay D., Harkinezhad T., van de Walle M., Beeckman D., van Droogenbroeck C., Verminnen K., Leten R., Martel A. & Cauwerts K. 2007. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13(7):1108-1110.
- Verminnen K., Van Loock M., Hafez H.M., Ducatelle R., Haesebrouck F. & Vanrompay D. 2006. Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydophila psittaci* antibodies in turkey sera. *Vet. Res.* 37:623-632.
- Webster J.D., Miller M.A., DuSold D. & Ramos-Vara J. 2009. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J Histochem. Cytochem.* 57(8):753-761.

## **7 ARTIGO 5**

Nesse item é apresentado o artigo "**Toxoplasmose sistêmica fatal em perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*)**" que será submetido para publicação na revista *Veterinary Parasitology*.

**Toxoplasmose sistêmica fatal em perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*)**

Renata A. Casagrande<sup>A,B</sup>, Aline D. Cabral<sup>C</sup>, Hilda F. J. Pena<sup>C</sup>, Veronica M. Rolim<sup>A</sup>,  
Luiz G. S. de Oliveira<sup>A</sup>, Fabiana M. Boabaid<sup>A</sup>, Angelica T. B. Wouters<sup>A</sup>, Flademir  
Wouters<sup>A</sup>, Cláudio E. F. Cruz<sup>A</sup>, David Driemeier<sup>A,D</sup>

<sup>A</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FaVet/UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Porto Alegre-RS, 91540-000, Brasil.

<sup>B</sup>Instituto Federal Catarinense, SC-283, Km 8, Vila Fragosos, Concórdia-SC, 89700-000, Brasil.

<sup>C</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Avenida Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo-SP, 05508-900, Brasil.

<sup>D</sup>Autor para correspondência: Dr. David Driemeier

Avenida Bento Gonçalves 9090, Agronomia 91540-000, Porto Alegre-RS, Brasil.

Fone: 55 (51) 33086107

E-mail: davetpat@ufrgs.br

## RESUMO

Uma perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*), macho, adulto, recentemente adquirida por um criatório no Rio Grande do Sul, apresentou súbita e severa apatia, dispneia, diarreia e morreu 18 horas após. À necropsia observaram-se palidez da musculatura, áreas esbranquiçadas no coração, espleno e hepatomegalia, pulmões avermelhados e consolidados. No exame histopatológico foram evidenciadas hepatite, miocardite, esplenite e nefrite necrótica mononuclear, gliose no encéfalo, necrose de medula óssea e pulmões. Em fígado, coração, baço, medula óssea, pulmões, traqueia, rins, adrenais, testículos, intestinos e pâncreas observou-se grande quantidade de estruturas sugestivas de taquizoítos de *T. gondii*, livres ou no interior de macrófagos intralésionais que foram positivas no exame de imuno-histoquímica anti-*T. gondii*. Foi realizada a genotipagem do agente, com emprego de 12 marcadores (*SAG1*, *SAG2*, *alt.SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, *Apico* e *CS3*), sendo o genótipo encontrado nessa perdiz o mesmo já identificado em galinha de fundo de quintal (TgCkBr156) no estado do Rio Grande do Sul. De acordo com a literatura, essa é a primeira descrição de toxoplasmose sistêmica fatal em perdiz-da-Califórnia.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Toxoplasma gondii*, imuno-histoquímica, ave, patologia.

## INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, enfermidade infecciosa cosmopolita, é causada pelo protozoário parasito intracelular *Toxoplasma gondii* e afeta uma grande variedade de mamíferos e aves (DUBEY *et al.*, 1998; DUBEY, 2002). O gato doméstico e os felídeos selvagens são os hospedeiros definitivos e excretam oocistos nas fezes. Nos hospedeiros intermediários, como as aves, há reprodução assexuada do parasito, com o desenvolvimento de doença clínica, aguda ou crônica, e subclínica (DUBEY *et al.*, 1998).

Nas aves, a infecção por *T. gondii* geralmente é subclínica, com formação de cistos teciduais (bradizoítos) que podem persistir por toda a vida (DUBEY, 2002). A infecção subclínica é mais comum em Galliformes (DUBEY *et al.*, 1993a; DUBEY,

2002; DUBEY *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 2007; MORÉ *et al.*, 2012), no entanto, casos fatais têm sido reportados esporadicamente nesse grupo (HOWERTH & RODENROTH, 1985; QUIST *et al.*, 1995; JONES *et al.*, 2012).

Em codornas e perdizes não há relatos de casos espontâneos de toxoplasmose, no entanto, um trabalho experimental com inoculação de *T. gondii* em codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) demonstrou que elas foram altamente suscetíveis a um isolado patogênico (DUBEY *et al.*, 1994) e, em outro experimento com Perdiz-da-Virgínia (*Colinus virginianus*), foi obtido o mesmo resultado (DUBEY *et al.*, 1993b).

A perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*) pertence a Ordem Galliformes, Família Odontophoridae. Essa ave é originária da Califórnia, oeste dos Estados Unidos. Na natureza é comumente encontrada em bosques, florestas e, devido a sua boa tolerância ao homem, pode também ser encontrada em áreas agrícolas. Devido a essas características, a perdiz-da-Califórnia se adapta bem ao cativeiro, sendo comercializada como ave ornamental em vários países do mundo, inclusive no Brasil (ADW, 2013).

O objetivo deste trabalho é descrever os achados anatomopatológicos, a caracterização imuno-histoquímica e molecular de um caso sistêmico fatal de toxoplasmose em uma perdiz-da-Califórnia. Esse parece ser o primeiro relato de infecção espontânea por *T. gondii* nessa espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Uma perdiz-da-Califórnia (*Callipepla californica*), macho, adulto, foi encaminhada para necropsia no Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAVET/UFRGS). Fragmentos de órgãos foram colhidos, fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para histologia e corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE).

### **Imuno-histoquímica para *Toxoplasma gondii***

Fragmentos de todos os órgãos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) pelo método da estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes dos tecidos em solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 vol.) em metanol por 10

minutos. Para a recuperação antigênica utilizou-se tripsina 0,1% por 10 minutos a 37°C e tampão citrato pH 6 por 2 minutos em micro-ondas (dois ciclos). O anticorpo policlonal anti-*T. gondii* (VMRD) foi diluído a 1:1000 em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 14-16 horas (*overnight*) a 4°C com o anticorpo primário e, após esta etapa, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado ligado a estreptavidina-peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, DakoCytomation) por 20 minutos cada etapa. O cromógeno utilizado para a revelação foi 3,3'-diaminobenzidina (DAB, K3468, DakoCytomation). Para a contracoloração foi utilizada a hematoxilina de Harris. Como controle positivo foi utilizado corte histológico de encéfalo de um bovino positivo para *T. gondii*.

### **Detecção molecular e genotipagem de *Toxoplasma gondii***

Fragmentos congelados de fígado, baço, pulmão e rim da perdiz foram encaminhados para o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) para caracterização molecular de *T. gondii* pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### *Extração do DNA*

Os fragmentos de tecido da perdiz foram homogeneizados com gral e pistilo e acrescidos de salina estéril 0,85%, distribuídos em microtubos de 2,0mL e armazenados em freezer a -70°C até o processamento.

Após o descongelamento, uma alíquota de 300µL do homogenado de tecidos de cada amostra foi separada e lavada duas ou três vezes com tampão TE (q.s.p. 1.500µL), pH 8 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), centrifugando-se a 12.000 g por 5 minutos. O DNA foi extraído com kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit /cat. A1125, Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. Os DNAs foram recuperados em um volume de eluição de 50µL.

#### *Detecção molecular de *Toxoplasma gondii**

A pesquisa de DNA de *T. gondii* foi realizada pela nested-PCR, tendo como alvo um fragmento de 155pb do gene B1. Para a reação de PCR foram utilizados 10µM de primers externos T1 (5'-AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA-3') e T2 (5'-

TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT-3') e, para a reação de nested-PCR, foram utilizados 10µM de primers internos T3 (5'-TGGGAATGAAAGAGACGCTAATGTG-3') e T4 (5'-TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG-3'), segundo protocolo descrito por Yai et al. (2003).

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR para uma reação de 50µL: 25,2µL de água ultrapura, 5,0µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 8,0µL da mistura de dNTPs - dATP, dTTP, dCTP, dGTP (1,25µM), 2,5µL de cada primer (10µM), 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,3µL de Taq DNA polimerase (5U/µl) e 5,0µL da amostra de DNA extraído. Para a nested-PCR foram utilizadas as mesmas quantidades da mistura de reagentes, utilizando-se 29,2µL de água ultrapura e 1,0µL do produto amplificado na PCR.

A PCR foi realizada com 25 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos, e a nested-PCR com 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos. As reações foram precedidas por uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e extensão final a 72°C por 10 min. Todas as reações foram reveladas em gel de agarose 2% com 0,3µg de brometo de etídeo.

#### *Genotipagem de Toxoplasma gondii*

A reação de polimerase em cadeia de polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP) foi realizada a partir do DNA extraído do rim e do pulmão da perdiz. Foram incluídas na reação amostras clonais (Tipos I, II e III) e de referência (Cougar, MAS, TgCatBr5) como controles.

Foram utilizados 12 marcadores (SAG1, 5'3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358, CS3 e Apico) capazes de distinguir, sem ambiguidade, as três linhagens clonais (Tipos I, II e III) após a amplificação do DNA-alvo e tratamento com enzimas de restrição (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008).

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas em dois multiplex PCR usando os primers externos para todos os marcadores (multiplex 1: SAG1, 5'3'SAG2, SAG3, BTUB e GRA6; multiplex 2: alt. SAG2, c22-8, c29-2, PK1, Apico, L358 e CS3) seguidos de nested-PCR para os marcadores individualmente,

utilizando os primers internos. Os produtos das PCRs foram primeiramente diluídos 1:2 em água ultrapura.

Utilizou-se a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação de 25 $\mu$ L: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200 $\mu$ M de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,10 $\mu$ M de cada primer, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e 1,5 $\mu$ L de DNA extraído. Na nested-PCR foi utilizada a mesma mistura, mas com 0,3 $\mu$ M de cada primer.

A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1,5 minutos. A nested-PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 min.

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra (SU et al., 2006), 3 $\mu$ L de cada produto de nested-PCR foram misturados a 17 $\mu$ L de reação de digestão contendo tampão NE (1x), 0,1mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) e uma unidade de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2-3%, contendo 0,5 $\mu$ g de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (pb), e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, USA).

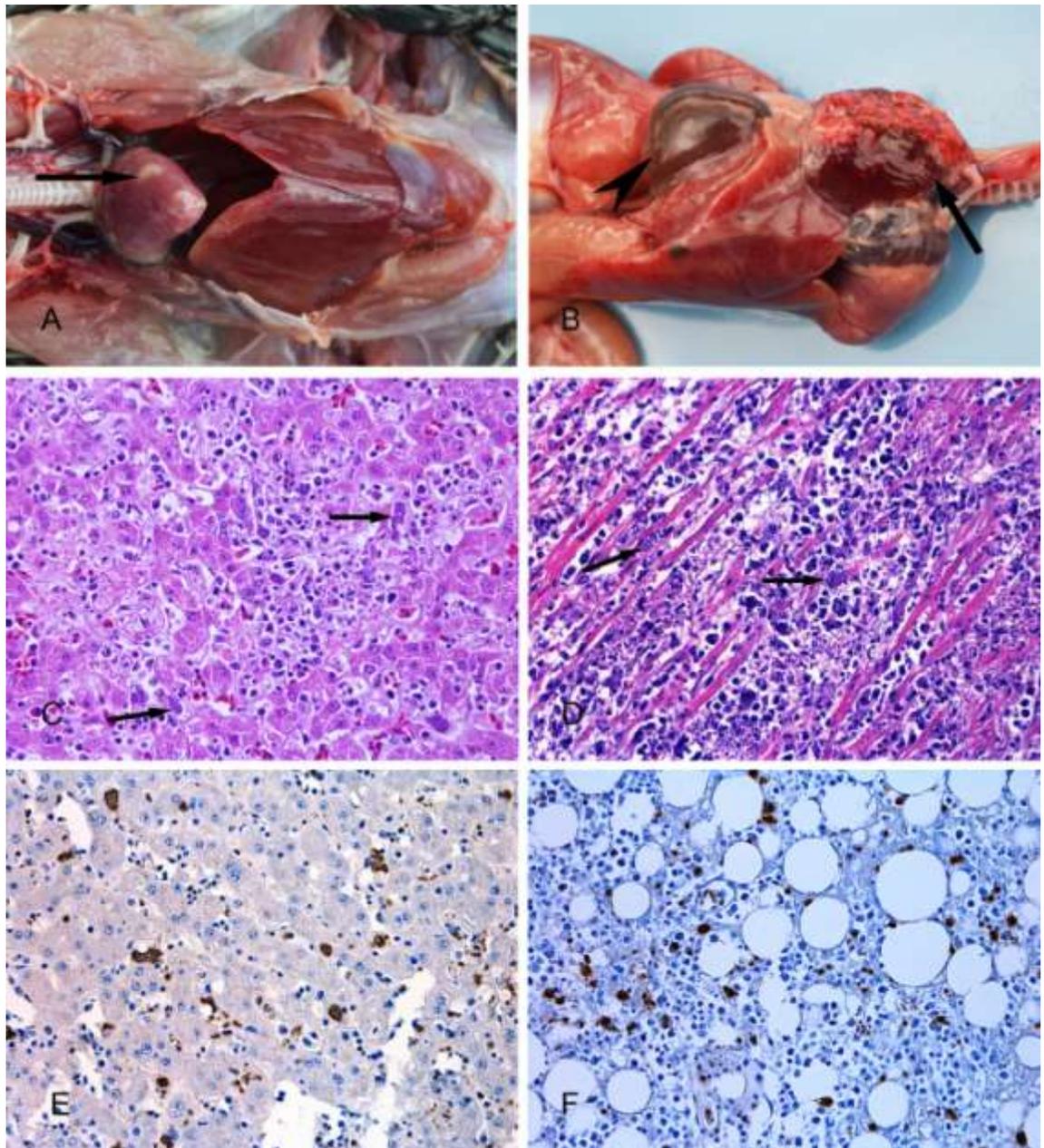
## RESULTADOS

Um criatório de aves ornamentais do estado do Rio Grande do Sul havia adquirido 40 dias antes dois casais de perdiz-da-Califórnia de outro criatório, do estado de São Paulo. Após o período de quarentena e adaptação em recinto externo, ao qual gatos domésticos tinham contato, a ave exibiu súbita e severa apatia, dispneia e diarreia, com morte 18 horas após constatação de doença clínica. A administração oral de um medicamento anti-infeccioso contendo tetraciclina, cloranfenicol e furazolidona e a manutenção em ambiente aquecido (28°C) foram as tentativas de tratamento.

À necropsia observaram-se bom estado corporal, palidez acentuada da musculatura esquelética, coração com áreas esbranquiçadas (Figura 1A), pulmões difusamente avermelhados e consolidados, esplenomegalia acentuada e hepatomegalia discreta (Figura 1B). No exame histopatológico foram evidenciados em fígado (Figura 1C), coração (Figura 1D), baço, pulmões e medula óssea necrose multifocal a coalescente severa, associada a infiltrado inflamatório de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Observaram-se ainda traqueíte necrótica mononuclear focal, nefrite mononuclear intersticial multifocal discreta e, em cérebro e cerebelo, gliose multifocal discreta. Foram observados também infiltrado mononuclear multifocal moderado na submucosa do esôfago e localmente extenso discreto na serosa do proventrículo. Em meio às lesões observadas em fígado, coração, medula óssea, pulmões, traqueia e rins havia grande quantidade de estruturas piriformes a ovaladas basofílicas, sugestivas de taquizoítos de *T. gondii*, livres ou no interior de macrófagos intralésionais.

No exame de IHQ anti-*T. gondii* houve marcação positiva intensa dos taquizoítos relacionados a focos inflamatórios em fígado (Figura 1E), miocárdio, baço, pulmões, medula óssea (Figura 1F), rins, esôfago, traqueia e lâmina própria dos intestinos. Observou-se também marcação no citoplasma de monócitos no lúmen de vasos sanguíneos em fígado, pulmões, coração, medula óssea, rins, adrenais, testículos e pâncreas. Em cérebro, cerebelo, medula espinhal, glúteo, proventrículo, músculo esquelético e pele não houve marcação.

Todos os tecidos da perdiz enviados para PCR do gene B1 de *T. gondii* foram positivos. Dos fragmentos de pulmão e rim foi possível realizar a genotipagem completa. Essas amostras apresentavam a seguinte característica: *SAG1* = alelo I, *SAG2* = alelo I, *alt.SAG2* = alelo I, *SAG3* = alelo III, *BTUB* = alelo III, *GRA6* = alelo III, *c22-8* = alelo I, *c29-2* = alelo I, *L358* = alelo III, *PK1* = alelo I, *Apico* = alelo III e *CS3* = alelo III; sequência característica do genótipo TgCkBr156 de *T. gondii*.



**Figura 1.** Toxoplasmose em Perdiz-da-Califórnia. **(A)** Coração com áreas esbranquiçadas (seta). **(B)** Pulmões avermelhados (seta) e baço severamente aumentado de volume (cabeça de seta). Hepatite **(C)** e miocardite **(D)** necrótica mononuclear com grande quantidade de estruturas piriformes a ovaladas basofílicas, sugestivas de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (setas). HE. Obj.40. Imuno-histoquímica anti-*T. gondii*: marcação positiva em fígado **(E)** e em medula óssea **(F)**. Estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. Obj.40.

## DISCUSSÃO

Muitos trabalhos demonstraram a infecção por *T. gondii* em diversas espécies de aves por técnicas sorológicas e de biologia molecular, no entanto, na maioria destas espécies a infecção é subclínica (DUBEY, 2002; DUBEY *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 2007; DUBEY, 2008; MORÉ *et al.*, 2011; MILLAR *et al.*, 2012). A toxoplasmose clínica fatal é uma enfermidade importante para Columbiformes e Passeriformes (WORK *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2001; DUBEY, 2002). A enfermidade sistêmica e fatal também já foi descrita em Psittaciformes (HOWERTH *et al.*, 1991; HARTLEY *et al.*, 2008; FERREIRA JR. *et al.*, 2012), Anseriformes (DUBEY *et al.*, 2001), Falconiformes (SZABO *et al.*, 2004) e Sphenisciformes (MASON *et al.*, 1991; PLOEG *et al.*, 2011).

Em surtos de toxoplasmose a mortalidade pode ser elevada (WORK *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2001; HARTLEY *et al.*, 2008; PLOEG *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2012). Nesse relato morreu apenas uma das quatro perdizes adquiridas. Aves acometidas por toxoplasmoses, muitas vezes, morrem sem apresentar sinais clínicos (HOWERTH & RODENROTH, 1985; DUBEY *et al.*, 2001), ou apresentam apenas sinais inespecíficos, como prostração (FERREIRA JR. *et al.*, 2012). Alguns animais apresentam dificuldade respiratória, como foi visto no presente caso (HOWERTH *et al.*, 1991; SZABO. *et al.*, 2004), ou sinais neurológicos (PLOEG *et al.*, 2011). A morte, na maioria dos relatos, ocorre em menos de um dia após início dos sinais (HARTLEY *et al.*, 2008; PLOEG *et al.*, 2011; FERREIRA JR. *et al.*, 2012).

As lesões macroscópicas de consolidação pulmonar, esplenomegalia e hepatomegalia observadas nesse relato são semelhantes a outros casos de toxoplasmose (HOWERTH *et al.*, 1991; WORK *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*, 2001; SZABO. *et al.*, 2004; HARTLEY *et al.*, 2008; FERREIRA JR. *et al.*, 2012). Além disso, no presente caso observou-se palidez acentuada da musculatura, que provavelmente foi devida à extensa necrose de medula óssea, lesão essa incomum em aves com infecção por *T. gondii* (JONES *et al.*, 2012).

A infecção por *T. gondii* causa uma doença disseminada, com lesões necróticas em diversos órgãos, como pulmões, coração, fígado, baço, rins, sacos aéreos, encéfalo, adrenais, bursa de *Fabricius*, pâncreas, intestinos e globo ocular (HOWERTH *et al.*, 1991; MASON *et al.*, 1991; QUIST *et al.*, 1995; WORK *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*,

2001; WILLIAMS *et al.*, 2001; SZABO *et al.*, 2004; HARTLEY *et al.*, 2008; PLOEG *et al.*, 2011; FERREIRA JR. *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2012). Nessa perdiz, as lesões histológicas foram disseminadas, com evidenciação do parasito através da IHQ anti-*T. gondii* em diversos órgãos e no lúmen de vasos. O exame de IHQ é o principal método de diagnóstico utilizado nos casos de toxoplasmose em aves (HOWERTH *et al.*, 1991; MASON *et al.*, 1991; QUIST *et al.*, 1995; WORK *et al.*, 2000; DUBEY *et al.*, 2001; SZABO *et al.*, 2004; HARTLEY *et al.*, 2008; PLOEG *et al.*, 2011; FERREIRA JR. *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2012).

A constatação de aproximação de gatos do recinto da perdiz, com possibilidade de contaminação fecal no interior do mesmo, sugere infecção após aquisição da ave. A toxoplasmose já foi relatada tanto em aves cativas (HOWERTH *et al.*, 1991; DUBEY *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001; FERREIRA JR. *et al.*, 2012), com histórico de contato com fezes de gatos domésticos (HARTLEY *et al.*, 2008), como em aves de vida livre (QUIST *et al.*, 1995; WORK *et al.*, 2000; SZABO. *et al.*, 2004).

Através da genotipagem foi possível concluir que o genótipo de *T. gondii* encontrado nessa perdiz é o mesmo que já foi identificado por Dubey *et al.* (2007) em galinha de fundo de quintal (TgCkBr156) proveniente do Município de Canguçu, Rio Grande do Sul. Isso demonstra que a perdiz pode compartilhar o mesmo genótipo de *T. gondii* que circula em galinhas domésticas. Entretanto, esse genótipo foi bastante patogênico para a perdiz, enquanto que na galinha não ocasionou manifestação clínica e, quando inoculado em camundongo também não causou doença (DUBEY *et al.* 2007). De acordo com esse mesmo estudo, amostras de *T. gondii* provenientes do Brasil apresentam alta variabilidade genética e são bastantes distintas das amostras da América do Norte e Europa.

Os achados anatomopatológicos e a IHQ anti-*T. gondii* permitem concluir que a morte da perdiz foi devida à toxoplasmose aguda disseminada, provavelmente infectada por oocistos eliminados por gatos com acesso às imediações do recinto em que a ave era mantida.

Ressalta-se assim a importância de evitar o contato de aves selvagens cativas com fezes de felinos. Estudos futuros devem ser conduzidos para determinar a real prevalência e a importância da toxoplasmose nas criações de aves selvagens, bem como em populações de aves de vida livre no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ADW. ANIMAL DIVERSITY WEB. University of Michigan, Museum of Zoology. Estados Unidos, 2013. Disponível em:  
<[http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Callipepla\\_californica/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Callipepla_californica/)> Acesso em: 12 mar. 2013.
- DUBEY, J. P.; RUFF, M. D.; CAMARGO, M. E.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. L.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation of *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.1668-1672, 1993a.
- DUBEY, J. P.; RUFF, M. D.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). **Journal of Parasitology**, v.79, p.935-939, 1993b.
- DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in Japanese Quail. **Journal of Veterinary Diagnostics**, v.6, p.216-221, 1994.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, n.2, p.267-299, 1998.
- DUBEY, J. P.; GARNER, M. W.; WILLETTE, M. M.; BATEY, K. L.; GARDINER, C. H. Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. **Journal of Parasitology**, v.87, p.219-223, 2001.
- DUBEY J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.121-153, 2002.
- DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.92, p.36-40, 2006.
- DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.182-188, 2007.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.60-73, 2008.
- FERREIRA JR., F. C.; DONATTI, R. V.; MARQUES, M. V. R.; ECCO, R.; PREIS, I. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; VILELA, D. A. R.; MARTINS, N. R. S. Fatal

toxoplasmosis in a vinaceous amazon parrot (*Amazona vinacea*). **Avian Diseases**, v.56, p.774–777, 2012.

HARTLEY, J.; BOOTH, R.; SLOCOMBE, R. F.; DUBEY, J. P. Lethal toxoplasmosis in an aviary of kakarikis (*Cyanoramphus* spp.) in Australian. **Journal of Parasitology**, v.94, p.1424-1425, 2008.

HOWERTH, E. W.; RODENROTH, N. Fatal systemic toxoplasmosis in a wild turkey. **Journal of Wildlife Diseases**, v.21, p446–449, 1985.

HOWERTH, E. W.; RICH, G.; DUBEY, J. P.; YOGASUNDRAM K. Fatal toxoplasmosis in a red lory (*Eos bornea*). **Avian Diseases**, v.35, p.642–646, 1991.

JONES, K. H.; WILSON, F. D.; FITZGERALD, S. D.; KIUPEL, M. A Natural outbreak of clinical toxoplasmosis in a backyard flock of guinea fowl in Mississippi. **Avian Diseases**, v.56, p.750–753, 2012.

MASON, R. W.; HARTLEY, W. J.; DUBEY, J. P. Lethal toxoplasmosis in a little penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. **Journal of Parasitology**, v.77, p.328, 1991.

MILLAR, P. M.; ALVES, F. M. X.; TEIXEIRA, V. Q.; VICENTE, R. T.; MENEZES, E. M.; SOBREIRO, L. G. O.; PEREIRA, V. L. A.; AMENDOEIRA, M. R. R. Occurrence of infection with *Toxoplasma gondii* and factors associated with transmission in broiler chickens and laying hens in different raising systems. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.3, p.231-236, 2012.

MORÉ, G.; MAKSIMOV, P.; PARDINI, L.; HERRMANN, D. C.; BACIGALUPE, D.; MAKSIMOV, A.; BASSO, W.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G.; VENTURINI, M. C. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.184, p.116–121, 2012.

PLOEG, M.; ULTEE, T.; KIK, M. Disseminated Toxoplasmosis in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Avian Diseases**, v.55, p.701-703, 2011.

QUIST, C. F.; DUBEY, J. P.; LUTTRELL, M. P.; DAVIDSON, W. R. Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and serologic survey. **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, p.255–258, 1995.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.561-569, 2008.

SZABO, K. A.; MENSE, M. G.; LIPSCOMB, T. P.; FELIX, K. J.; DUBEY, J. P. Fatal toxoplasmosis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). **Journal of Parasitology**, v.90, p.907–908, 2004.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v.36, p.841-848, 2006.

WILLIAMS, S. M.; FULTON, R. M.; RENDER, J. A.; MANSFIELD, L.; BOULDIN, M. Ocular and encephalic toxoplasmosis in Canaries. **Avian Diseases**, v.45, p.262-267, 2001.

WORK, T. M.; MASSEY, J. G.; RIDEOUT, B. A.; GARDINER, C. H.; LEDIG, D. B.; KWOK, O. C. H.; DUBEY J. P. Fatal toxoplasmosis in free-ranging endangered 'alala from Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p. 205–212, 2000.

YAI, L. E. O.; VIANNA, M. C. B.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and Polymerase Chain Reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.227-234, 2003.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo realizou-se a tríade de diagnóstico: caracterização anatomopatológica (macroscopia e histopatologia) e identificação de agentes infecciosos em órgãos com lesões, através do cultivo microbiológico, da padronização e do desenvolvimento de técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

Pode-se observar que esses três exames apresentaram alta concordância e foram eficiente no diagnóstico e caracterização das doenças infecciosas que acometem as aves de produção e ornamentais.

O exame de imuno-histoquímica, técnica essa bastante utilizada para o diagnóstico de doenças em mamíferos, demonstrou ser eficaz no diagnóstico de enfermidades infecciosas nas aves. Nesse estudo *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydia* sp., *Salmonella* sp. e *Toxoplasma gondii* foram identificados através dessa técnica.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) também foi eficaz no auxílio do diagnóstico das enfermidades infecciosas das aves. Através da PCR em tempo real pode identificar *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* e realizar a genotipagem de *Toxoplasma gondii*.

Esse trabalho auxilia profissionais da área de sanidade aviária, já que esses poderão utilizar as técnicas de diagnóstico desenvolvidas para doenças infecciosas em aves de produção e ornamentais.

## REFERÊNCIAS

ANSONG-DANQUAH, J. A survey of carcass condemnation at a poultry abattoir and its application to disease management. **The Canadian Veterinary Journal**, v.28, p.53-56, 1987.

BRASIL. Portaria n.º 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). In: BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 182, de 22 de setembro de 1994, Seção I.

**COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS - CBRO**. Listas das aves do Brasil. 10ª Edição, 17 2011. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 01 de novembro de 2013.

SAIF Y.M. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell: Iowa, 2008, 1324p.