

## Detecção molecular e isolamento de *Mycoplasma* spp. em psitacídeos no estado de Pernambuco, Brasil

[*Molecular detection and isolation of Mycoplasma spp. in psittacines in Pernambuco state, Brazil*]

L.T.R. Silva<sup>1</sup>, S.B. Santos<sup>1</sup>, L.C. Rameh-de-Albuquerque<sup>2</sup>, D.B. Siqueira<sup>2</sup>, M.M.R. Amorim<sup>1</sup>, J.C. Almeida<sup>1</sup>, A.A.F. Oliveira<sup>1\*</sup>, R.A. Mota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife, PE

<sup>2</sup>Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos – Recife, PE

### RESUMO

Objetivou-se com este estudo investigar a ocorrência de *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma galissepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) em psitacídeos de cativeiro localizado no estado de Pernambuco, Brasil. Foram estudadas 85 aves provenientes do Parque Estadual Dois Irmãos, localizado no estado de Pernambuco, Brasil. De cada psitacídeo analisado foram obtidas três amostras por meio de swabs da cloaca, palato e conjuntiva totalizando 255 amostras. As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo as positivas submetidas ao isolamento em ágar Frey. O DNA de *Mycoplasma* spp. foi detectado em 16,47% (14/85) dos psitacídeos estudados. Das 255 amostras analisadas, 6,66% (17/255) foram positivas para a presença de *Mycoplasma* spp., sendo 41,18% (7/17) provenientes da conjuntiva, 35,29% (6/17) do palato e 23,53% (4/17) da cloaca. Nenhuma amostra foi positiva para MG ou MS na PCR. Os resultados obtidos permitem confirmar a presença do DNA de *Mycoplasma* spp. em conjuntiva, palato e cloaca nas aves estudadas. Foram detectadas colônias semelhantes a membros da classe Mollicutes em 17,64% das amostras (3/17). Esse é o primeiro relato da presença de *Mycoplasma* spp. em psitacídeos de cativeiro no Nordeste do Brasil.

Palavras-chave: diagnóstico molecular, micoplasmose, psittaciformes

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma galissepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) in captive psittacines. Eighty-five wild birds from Parque Estadual Dois Irmãos, Pernambuco state, northeastern Brazil, were used. From each psittacid analyzed three samples were obtained through cloaca, palate and conjunctiva swabs, totaling 255 samples. Samples collected were submitted to DNA extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR). *Mycoplasma* spp. DNA was detected in 16.47% (14/85) of psittacines studied. From 255 samples, 6.66% (17/255) were positive for *Mycoplasma* spp.: 41.18% (7/17) of positivity in conjunctiva, 35.29% (6/17) in palate and 23.53% (4/17) in cloaca. There was no positive sample for MG or MS in PCR. Similar colonies were found for members of the Mollicutes Class in 17.64% of the samples (3/17). The results confirmed *Mycoplasma* spp. DNA in conjunctiva, palate and cloaca from the wild birds analyzed. This is the first record of *Mycoplasma* spp. in captive psittacines from northeastern Brazil.

Keywords: molecular diagnosis, mycoplasmosis, psittaciformes

### INTRODUÇÃO

*Mycoplasma* spp. são microrganismos da classe Mollicutes, caracterizados pela ausência de parede celular decorrente da deficiência de

informação genética para sua síntese, distinguindo-os das bactérias verdadeiras (Nascimento, 2000). As espécies de micoplasmas colonizam preferencialmente as mucosas dos tratos respiratório e genital, aderindo-se intimamente às paredes celulares do hospedeiro,

Recebido em 22 de abril de 2015

Aceito em 16 de setembro de 2015

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: andreafo@hotmail.com

permanecendo de forma inócua ou determinando doenças crônicas (Gerlach, 1994).

Em aves silvestres, a presença do agente foi relatada inicialmente por Furr *et al.* (1977) em amostras procedentes de falcões (*Falco cherrug* e *Falco peregrinus*) em cativeiro e, posteriormente, em outras espécies, como águias (*Buteo buteo* e *Buteo lagopus*) (Bolske e Morner, 1981), abutres (*Aegypius monachus*), grifos (*Gyps fulvus*) (Poveda *et al.*, 1990; Lecis *et al.*, 2010), gaviões (*Accipiter nisus*) (Lierz *et al.*, 2000), *House finches* (*Carpodacus mexicanus*) (Faustino *et al.*, 2004), passeriformes (Duarte *et al.*, 2006) e psitacídeos (Lierz e Hafez, 2009; Gomes *et al.*, 2010). A infecção por *Mycoplasma* spp. pode ser claramente perceptível no aspecto clínico. Porém, na maioria das vezes, ocorre de forma assintomática (Fisher *et al.*, 1997).

No Brasil, são escassos os relatos de micoplasmose em aves silvestres. No estado de São Paulo, Duarte *et al.* (2006) detectaram, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), positividade em 29% das amostras estudadas para *Mycoplasma* spp. em passeriformes sem sinais clínicos evidentes. A prevalência de micoplasmas em 14 espécies de aves de rapina, pelo método de soroaglutinação rápida, foi relatada por Lemos *et al.* (2007) no estado do Rio de Janeiro, sendo nenhum animal reagente. Entretanto, houve o isolamento de *Mycoplasma* spp. em 4% das amostras analisadas. Por sua vez, Gomes *et al.* (2010) relataram o isolamento de *M. gallisepticum* em cloaca, traqueia e palato de psitacídeos mortos, no estado de Minas Gerais, e em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) com micoplasmose clínica (Gomes *et al.*, 2012). Carvalho (2012) detectou em 14 espécies de psitacídeos DNA de *M. gallisepticum*, e, em três espécies, DNA de *M. synoviae* em Goiás.

Na região Nordeste do Brasil, não existem relatos de identificação de *Mycoplasma* spp. em aves silvestres de cativeiro.

Objetivou-se com o presente estudo investigar a ocorrência de *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) em psitacídeos de cativeiro localizado no estado de Pernambuco, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 85 psitacídeos de diferentes espécies, cativos no Zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos, localizado no estado do Pernambuco, região Nordeste do Brasil.

As aves foram contidas fisicamente e submetidas a exame clínico detalhado. Em seguida, foram obtidas amostras da conjuntiva, região palatina e cloaca utilizando-se *swabs* estéreis. Posteriormente, os *swabs* foram cortados e acondicionados em tubos de polipropileno contendo 1mL de tampão fosfato salino (PBS, 7,2 pH) estéril, encaminhados ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas e mantidos a 10°C até o momento da análise.

No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm e, em seguida, submetidas à extração de DNA pelo kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, USA/Ref.A1125), conforme o protocolo do fabricante.

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 1µL de cada *primer* para *Mycoplasma* spp. (30pmol), *M. gallisepticum* (20pmol) e *M. synoviae* (20pmol), 14µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 1,5µL de tampão (10xconcentrado), 1,0µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,0µL de DNTP (0,2mM) de cada nucleotídeo, 0,5µL de Taq DNA polimerase e 5µL do DNA extraído. Os *primers* utilizados foram: MGSO (5'-TGC ACCATCTGCTCACTCTGTAAACCTC-3') e GPO3 5'- GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' para a classe Mollicutes spp. (Van Kuppeveld *et al.*, 1993; Van Kuppeveld *et al.*, 1994), MG-14F: 5'-GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC-3' e MG-13R: 5'-GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC-3', para a espécie *M. gallisepticum*; MS-F: 5'-GAGAAGCAAATAGTGATATCA-3' e MS-R: 5'-CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA-3', para a espécie *M. synoviae* (OIE, 2008).

Os perfis térmicos foram realizados para gênero (Van Kuppeveld *et al.*, 1994) e para as espécies *M. gallisepticum* (OIE, 2008) e *M. synoviae* (Lauerman, 1998). Todas as reações foram realizadas em termociclador Bioer XP Thermal

### Detecção molecular...

Cycler® (Bioer Technology Co. Ltda., Hangzhou, China). O DNA amplificado foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *Blue Green*, para visualização por luz ultravioleta, e fotodocumentado.

As amostras positivas na PCR para *Mycoplasma* spp. foram submetidas ao isolamento e à coloração específica. Para o isolamento, foram utilizados 100µL da amostra que, posteriormente, foi diluída em meio Frey de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup>, e a última diluição foi semeada em 2mL do caldo Frey e ágar Frey (Whitford *et al.*, 1994). Os tubos e as placas foram incubados a 37°C. As placas foram mantidas em condições de microaerofilia, sendo examinadas semanalmente para observação do crescimento de colônias sugestivas. As colônias sugestivas para *Mycoplasma* spp. foram submetidas à coloração de Dienes (Whitford *et al.*, 1994).

Para análise estatística dos resultados, empregou-se a análise descritiva pelos cálculos das frequências absolutas e relativas (Sampaio, 1998).

O trabalho em questão obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença N<sup>o</sup> 015/2012) e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – Sisbio (Licença N<sup>o</sup> 33625-1).

### RESULTADOS

Na PCR, 16,47% (14/85) dos psitacídeos foram positivos para *Mycoplasma* spp. (Fig. 1). Foram coletadas 255 amostras de *swabs*, das quais: 17 foram positivas para a presença de *Mycoplasma* spp., sendo 41,18% (7/17) provenientes da conjuntiva, 35,29% (6/17) do palato e 23,53% (4/17) da cloaca. As aves positivas foram das espécies: *Ara ararauna* (n=1), *Ara glaucogularis* (n=1), *Guaruba guarouba* (n=1), *Ara chloropterus* (n=1), *Aratinga solstitialis jandaya* (n=4) e *Ara macao* (n=1), *Pionites leucogaster* (n=2), *Amazona aestiva* (n=1), *Anodorhynchus hyacinthinus* (n=2). Nenhuma das amostras foi positiva na PCR para *M. gallisepticum* ou *M. synoviae*.

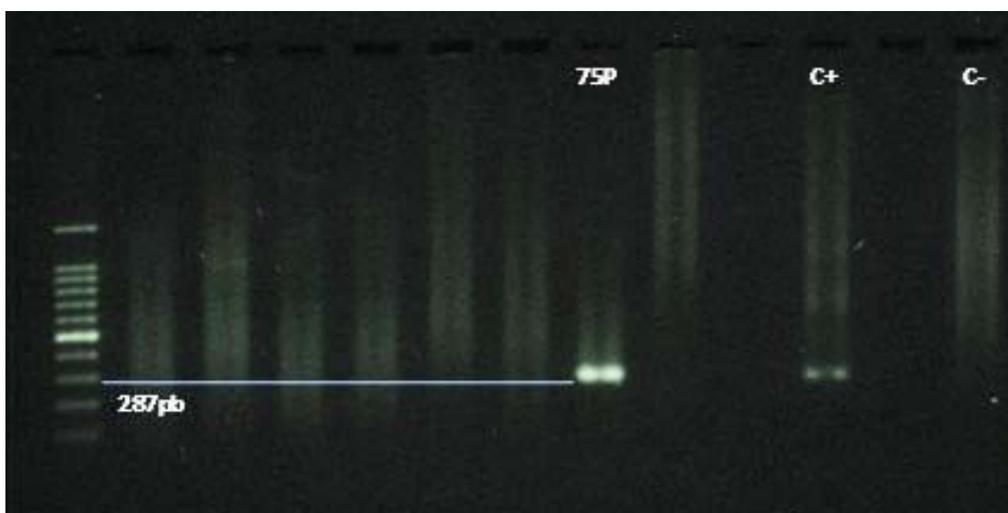


Figura 1. Eletroforese das amostras de psitacídeos procedentes do Zoológico Parque Estadual Dois Irmãos, Pernambuco, Brasil. Produto de 287pb, correspondente a uma amostra positiva (75P) para *Mycoplasma* spp. C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Após o cultivo, foram detectadas colônias semelhantes a membros da classe Mollicutes em 17,64% das amostras (3/17). Essas amostras foram, posteriormente, coradas pelo método de

Dienes, confirmando o isolamento. A discriminação das amostras positivas na PCR e ao isolamento em relação a cada espécie encontra-se listada na Tab. 1.

Tabela 1. Quantitativo de psitacídeos estudados e resultados do isolamento e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Mycoplasma* spp., Recife-PE, 2014

Espécie	Nome vulgar	FA-PCR	FR-PCR (%)	FA-I	FR-I (%)	TA
<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	1	8,3	0	0	12
<i>Ara glaucogularis</i>	Arara-boliviana	1	100	0	0	1
<i>Pionus fuscus</i>	Curica-roxa	0	0	-	-	2
<i>Pionus menstruus</i>	Curica-de-cabeça-azul	0	0	-	-	2
<i>Deropterus accipitrinus</i>	Anacã	0	0	-	-	5
<i>Pionus maximiliani</i>	Curica-verde	0	0	-	-	1
<i>Pionites melanocephala</i>	Marianinha-de-cabeça-preta	0	0	-	-	1
<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	1	10	0	-	10
<i>Ara chloropterus</i>	Arara-vermelha	1	25	1	100	25
<i>Ara nobilis</i>	Ararinha-nobre	0	0	-	-	1
<i>Ara severus</i>	Maracanã-guaçu	0	0	-	-	1
<i>Primolius auricollis</i>	Maracanã-de-colar	0	0	-	-	1
<i>Aratinga solstitialis jandaya</i>	Jandaia-verdadeira	4	66,6	0	0	6
<i>Ara macao</i>	Arara-canga	1	50	0	0	2
<i>Amazona farinosa</i>	Papagaio-moleiro	0	0	-	-	2
<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio-do-mangue	0	0	-	-	2
<i>Aratinga aurea</i>	Periquito-rei	0	0	-	-	2
<i>Pyrrhura perlata</i>	Tiriba-de-barriga-vermelha	0	0	-	-	4
<i>Pionites leucogaster</i>	Marianinha-de-cabeça-amarela	2	33,3	0	0	6
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	1	10	1	100	10
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul	2	66,6	1	50	3
<i>Aratinga cactorum</i>	Gangarra	0	0	-	-	7
Frequência global		14	16,47	3	21,4	85

FA-PCR: frequência absoluta de positivos na PCR para *Mycoplasma* spp.; FR-PCR: frequência relativa de positivos na PCR para *Mycoplasma* spp.; FA-I: frequência absoluta de positivos no isolamento; FR-I: frequência relativa de positivos no isolamento; TA: total de aves estudadas por espécie.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, todas as aves estavam clinicamente saudáveis, no entanto fatores ambientais (espaço comum das aves, recintos e ventilação) podem ter contribuído para a maior positividade na PCR das amostras oriundas das jandaias (*Aratinga solstitialis jandaya*), uma vez que estas se encontravam na quarentena, onde os recintos são pequenos, favorecendo o maior contato entre as aves, o que, segundo Fisher *et al.* (1997), pode predispor à disseminação do agente por meio de aerossóis. Os tipos de recintos dos animais podem ser determinantes na dinâmica das micoplasmoses em aves.

Os mesmos fatores ambientais citados anteriormente podem ter contribuído para a positividade na PCR e no isolamento das amostras das araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) assim como na PCR das amostras

das marianinhas-de-cabeça-amarela (*Pionites leucogaster*). No caso da arara-canga (*Ara macao*), esta convivia em um recinto com outra ave de mesma espécie, que tinha apresentado quadro clínico confirmado pela PCR de micoplasmose, seis meses antes. A presença de *Mycoplasma* spp. nessa ave pode ter ocorrido pelo contato direto, embora não tenha sido observado nenhum sinal clínico.

A arara-canindé (*Ara ararauna*) positiva na PCR apresentava histórico de micoplasmose, mas, no momento da coleta, apresentava-se clinicamente saudável. Porém, persistência do agente pode ocorrer posterior ao tratamento com antimicrobiano ou ao desenvolvimento de anticorpos (Fisher *et al.*, 1997). Além disso, esse indivíduo coabitava o mesmo recinto da arara-boliviana (*Ara glaucogularis*), que também apresentou resultado positivo na PCR neste estudo.

### Detecção molecular...

Gomes *et al.* (2010) identificaram *Mycoplasma* spp. em diversas espécies de psitacídeos, que também foram positivas para o agente na pesquisa: *Pionus fuscus*, *Ara ararauna*, *Amazona aestiva*, *Amazona amazonica*, *Aratinga jandaya*, *Guarouba guarouba* e *Anodorhynchus hyacinthinus*, assim como Carvalho (2012) identificou *M. gallisepticum* em: *Ara ararauna*, *Ara chloropterus*, *Ara macao*, *Amazona amazonica*, *Amazona aestiva*, *Aratinga aurea*, *Aratinga jandaya* e *Guarouba guarouba*. No Brasil, são escassos os relatos de identificação de *Mycoplasma* spp. em psitacídeos, sendo esse o primeiro registro na região Nordeste.

As amostras positivas para *Mycoplasma* spp. foram testadas também para *M. synoviae* e *M. gallisepticum*, no entanto nenhuma foi positiva na PCR para essas espécies. Na literatura, são relatadas aproximadamente 23 espécies de *Mycoplasma* spp. que acometem aves, sendo *M. gallisepticum* a mais comum (Pennsylvania Game Commission, 2001). Segundo Friend (1999), a ocorrência de *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. gallinarum* e *M. melleagridis* em psitacídeos não é frequente ou não é reportada. No entanto, Gomes *et al.* (2010) observaram positividade de 85,4% de *M. gallisepticum* em swabs palatinos obtidos de psitacídeos mortos oriundos do tráfico. Esse índice elevado pode ser justificado pelo fato de que animais capturados decorrentes de tráfico comumente apresentam estresse, imunossupressão e má nutrição, facilitando a infecção pelo *M. gallisepticum* (Regueira e Bernard, 2012). Carvalho (2012) observou 21,62% de positividade para *M. gallisepticum* em psitacídeos oriundos do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres), 15,70% oriundos de criadores comerciais e 6,66% de criadores conservacionistas, demonstrando que a aglomeração de animais pode ser um fator importante para a disseminação do agente. Os mesmos animais também foram testados para *M. synoviae*; apenas 2,7% dos psitacídeos oriundos do CETAS e 1,9% de criadores conservacionistas foram positivos, demonstrando a baixa frequência do patógeno nessas espécies.

Outras espécies de *Mycoplasma* spp. podem estar associadas à positividade dessas amostras sem causar nenhum prejuízo à saúde dessas aves que estavam clinicamente saudáveis, uma vez que bactérias da classe Mollicutes geralmente agem

como simbioses, não promovendo danos ao hospedeiro e ocasionalmente determinando doenças crônicas (Razin *et al.*, 1998).

A baixa frequência de isolamento para Mollicutes neste estudo pode ser atribuída à quantidade de bactérias viáveis na amostra ou à presença de uma quantidade pequena de bactérias no indivíduo, bem como a dificuldade de isolamento por meio de culturas procedentes amostras clínicas (Razin, 1994). É importante ressaltar que o isolamento de bactérias da classe Mollicutes requer a utilização de meios específicos enriquecidos, além de ser necessário o uso de inibidores de fungos e bactérias contaminantes, pois qualquer fator pode influenciar o crescimento efetivo dessas bactérias, dificultando o seu isolamento (Razin, 1994; Razin *et al.*, 1998).

### CONCLUSÃO

A presença de DNA de *Mycoplasma* spp. em amostras biológicas das aves estudadas caracteriza o primeiro relato de identificação da espécie em aves silvestres de cativeiro na região Nordeste do Brasil.

### AGRADECIMENTOS

Aos dirigentes do Zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife-PE, por possibilitarem a realização deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

- AVIAN mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE, 2008. p.482-486. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.05\\_%20AVIAN\\_MYCO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf)>. Acessado em: 20 jan. 2015.
- AVIAN mycoplasmosis. Pennsylvania: Pennsylvania Game Commission Wildlife Disease Reference Library, 2001. Disponível em: <<http://www.portal.state.pa.us>>. Acessado em: 24 abr. 2014.
- BØLSKE, G.; MÖRNER, T. Isolation of a *Mycoplasma* spp. from three Buzzards (*Buteo* spp). *Avian Dis.*, v.26, p.406-441, 1981.
- BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A. *et al.* Detecção de resposta sorológica contra mycoplasma em aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, p.143-148, 2006.

- CARVALHO, A.M. *Chlamydophila* spp., *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em psitacídeos (Filo: Cordata, Ordem: Psittaciformes) de diferentes cativos no Estado de Goiás. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- DUARTE, V.V.; SINHORINI, J.A.; ALLEGRETTI, L. et al. Identificação de *Mycoplasma* spp. em Passeriformes. In: ENCONTRO DA ASM (ÁREAS DE SOLTURA E MONITORAMENTO DE ANIMAIS SILVESTRES), 1., 2006, São Paulo. Relatório de atividades ... São Paulo: IBAMA, 2006, p.22.
- FAUSTINO, C.R.; JENNELLE, C.S.; CONNOLLY, V. et al. *Mycoplasma gallisepticum* infection dynamics in a house finch population: seasonal variation in survival, encounter and transmission rate. *J. Anim. Ecol.*, v.73, p. 651-669, 2004.
- FISCHER, J.R.; STALLKNECHT, D.E.; LUTTRELL, M.P. et al. Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, p.69-72, 1997.
- FRIEND, M. Mycoplasmosis. In: FRIEND, M.; FRANSON, J.C. (Eds.). *Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds*. Lincoln: University of Nebraska / National Wildlife Health Center, 1999. p.115-120.
- FURR, P.M.; COOPER, J.E.; TAYLOR-ROBINSON, D. Isolation of *Mycoplasmas* from three falcons (*Falco* spp). *Vet. Rec.*, v.100, p.72-73, 1977.
- GERLACH, H. *Mycoplasma* and *Rickettsia*. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. (Eds.). *Avian medicine: principles and applications*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994, p.1053-1060.
- GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R. et al. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.*, v.12, p.75-78, 2010.
- GOMES, A.M., ORTIZ, M.C., CARVALHAES, A.G., MARTINS, N.R.S. *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) com doença respiratória - relato de caso. *Rev. Clin. Vet.*, n. 98, p. 104-108, 2012.
- KUPPEVELD, V.F.J.M.; LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F. et al. Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16 rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2606-2615, 1993.
- KUPPEVELD, V.F.J.M.; JOHANSSON, K.E.; GALAMA, J.M.D. et al. Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures by a *Mycoplasma* Group-Specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, p.149-152, 1994.
- LAUERMAN, L.H. *Mycoplasma* PCR assays: nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Alabama: Department of Agriculture and Industries, 1998. 150p.
- LECIS, R.; CHESSA, B.; CACCIOTTO, C. et al. Identification and characterization of novel *Mycoplasma* spp. belonging to the hominis group from griffon vultures. *Res. Vet. Sci.*, v. 89, p. 58-64, 2010.
- LEMOS, M.; FUKI, L.T.; BARRETO, M.L. et al. Prevalência de micoplasmas em aves de rapina no estado do Rio de Janeiro. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE MEDICINA DE CONSERVAÇÃO, 1., 2007, Vitória, ES. *Anais...* Vitória: [s.n] 2007. p.25.
- LIERZ, M.; HAFEZ, H.M. *Mycoplasma* species in psittacine birds with respiratory disease. *Vet. Rec.*, v.164, p.629-630, 2009.
- LIERZ, M.; SCHMIDT, R.; BRUNNBERG, L. et al. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.*, v.47, p.63-67, 2000.
- NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.
- POVEDA, J.B.; GIEBEL, J.; KIRCHHOFF, H. et al. Isolation of mycoplasmas from a buzzard, falcons and vultures. *Avian Pathol.*, v.19, p.779-783, 1990.
- RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. *Mol. Cell. Probes.*, v.8, p.497-511, 1994.
- RAZIN, S., YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.1094-1156, 1998.
- REGUEIRA, R.F.; BERNARD, E. Wildlife sinks: quantifying the impact of illegal bird trade in street markets in Brazil. *Biol. Cons.*, v.149, p.16-22, 2012.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- WHITFORD H.W.; ROSENBUSCH R.F.; LAUERMAN L.H. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University Press, 1994. 173p.