

31

Circular
Técnica

O *Mycoplasma synoviae* em Galinhas Comerciais

I. O Diagnóstico e o Controle em Perspectiva

A - Introdução

Os micoplasmas patogênicos são alvo de controle rigoroso na avicultura. Sobretudo o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *Mycoplasma synoviae* (MS) são objetos de grande preocupação porque causam doenças endêmicas e são transmitidos verticalmente através de ovos contaminados por galinhas infectadas. Essas características determinam a permanência indefinida do patógeno em uma granja e ainda potencializam os efeitos da infecção nos próximos extratos ou fases da produção, caso nenhum programa de controle seja aplicado. O impacto de uma infecção por micoplasmas na criação de aves pode ser considerável, tanto na redução da produtividade quanto nas transações comerciais que possivelmente envolvam progênie oriunda de plantel infectado. No caso de MS, esse efeito é, às vezes, claramente perceptível, porém na maioria das vezes a infecção por MS cursa de forma assintomática e a mensuração de seu impacto econômico se torna difícil.

Concórdia, SC
Novembro, 2002

Autor

Laurimar Fiorentin
Méd. Vet., Ph.D.
Embrapa Suínos e Aves
Caixa Postal 21
CEP 89.700-000
Concórdia-SC
laurimar@cnpsa.embrapa.br

Esta publicação faz uma revisão atualizada e adaptada às características da infecção por MS em galinhas no Brasil. São descritas a apresentação da doença e dos quadros de infecção assintomática, os tratamentos adequados quando necessário e as formas de controle do organismo para evitar a contaminação de lotes livres, ou retornar à condição de livre de MS. O texto refere-se mais freqüentemente à matrizes por serem esses os plantéis nos quais a infecção por MS incide de forma mais preocupante. Os questionamentos envolvendo a virulência do MS e sua importância como patógeno para a avicultura são discutidos na luz das informações disponíveis na literatura, porém corroboradas pela experiência prática no controle da infecção em plantéis brasileiros. O conteúdo resulta, portanto, não perfeitamente coincidente com as descrições de textos clássicos, mas proporciona uma visão ampliada das possíveis ramificações da infecção por MS, desde o questionamento de seu impacto discutível sobre alguns estratos da produção até as exigências do controle oficial exercido pelos órgãos responsáveis pela vigilância sanitária no Brasil.

Foto: Laurimar Fiorentin



B - Histórico

Sinovites infecciosas provavelmente causadas por MS em frangos foram inicialmente descritas em 1954. A denominação "*Mycoplasma synoviae*" foi proposta em 1964, quando os micoplasmas passaram a ser classificados como espécies. Pesquisas executadas nos Estados Unidos da América durante a década de sessenta, sugeriram que MS era um agente infeccioso de grande importância tanto em galinhas como em perus, especialmente devido à apresentação crônica da infecção e à transmissão do agente *via ovo*. Essa observação induziu ao controle de MS como um dos principais patógenos da avicultura tecnificada e estimulou pesquisas para o desenvolvimento de métodos adequados de vigilância, diagnóstico e controle do agente.

No Brasil, essa infecção parece nunca ter sido uma grande preocupação como patologia, embora desde a década de 1980 já houvessem relatos de lotes de frangos reativos em sorologias para MS. A infecção ocorre de forma assintomática na maioria das vezes, o que aliado à carência ocorrida na difusão de técnicas de diagnóstico especializadas permitiu ampla disseminação no extrato de produção de ovos de consumo e em certo grau em reprodutoras de frangos de corte. A não ocorrência de quadros que cursassem com sinais e lesões levou a acreditar que MS não ocorria de forma disseminada no Brasil. Mesmo diante de resultados positivos em testes sorológicos, muitos produtores hesitaram em acreditar que seus plantéis estivessem infectados em função da não manifestação clínica na forma descrita na literatura.

A falta da identificação clara de um impacto negativo sobre a produção também permitiu o adiamento das tomadas de decisão para o controle do MS ao nível da produção. Lotes de reprodutoras infectados ou não por MS foram, inúmeras vezes, tidos como igualmente produtivos por não ter sido possível identificar claramente as perdas, ou pela não ocorrência de outra infecção conjuntamente esses lotes tinham, realmente, a mesma produtividade de lotes livres de micoplasmas. Um estudo verdadeiramente abrangente e profundo nunca foi conduzido para avaliar a virulência das cepas de MS que ocorrem no Brasil. Somente recentemente alguns trabalhos foram iniciados para a caracterização das amostras brasileiras de MS.

A ocorrência de resposta sorológica sem que se obtivesse isolamento do MS também fomentou a teoria de que essas reações seriam não específicas, portanto não indicadoras de infecção pelo agente. Hoje se sabe que muitas reações sorológicas eram realmente respostas à infecção, às dificuldades de

isolamento, inerentes às dificuldades de cultivo do MS, aliadas à falta de adequação dos laboratórios e à não existência de um quadro clínico definido. A precocidade de abate dos frangos praticada no Brasil, aliada ao baixo percentual de ovos contaminados por matrizes naturalmente infectadas, que retardam o aparecimento de um quadro generalizado no lote, fez com que raramente uma ocorrência clínica da infecção por MS fosse detectada na avicultura de corte. Também, durante vários anos, o antígeno para soroaglutinação rápida (SAR), imprescindível para a vigilância de MS, não teve ampla disponibilidade no Brasil, dificultando a execução de programas abrangentes de controle.

Até 1994 o Brasil não possuía um programa específico para o controle de micoplasmas, embora o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) exercesse a vigilância oficial. Em anos recentes porém, a preocupação dos órgãos oficiais com o controle de MS em reprodutoras tem crescido. O estabelecimento do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) pelo Mapa e o incremento do comércio de aves vivas entre os países da América do Sul, transformou o MS em agente infeccioso sujeito ao controle da vigilância sanitária oficial de diferentes países, que impulsionaram o interesse pela vigilância das infecções por esse agente. O MS não está listado pela *Office International des Epizooties* (OIE) como organismo de controle internacional, mas tem sido comum que os países produtores de aves e ovos tenham preocupações com o MS em função de suas características de patógeno endêmico de difícil erradicação. O impacto da infecção também parece mais visível em alguns países, justificando a preocupação quando se trata do comércio internacional de aves vivas e ovos férteis.

C - O *Mycoplasma synoviae*

Micoplasmas são Eubactérias pequenas e com genoma reduzido, provavelmente originados por evolução reducionista a partir de uma bactéria comum ao grupo *Lactobacillus-Bacillus*. São organismos desprovidos de parede celular e elementos de DNA extra-cromossômico como plasmídeos e têm grande necessidade de interação com o hospedeiro, nos quais estão em geral associados à epitélios, interagindo intimamente com a membrana celular.

O MS é um organismo exigente quanto às condições para cultivo em laboratório, de crescimento lento e que necessita meio semi-sintético rico em nutrientes. O meio de Frey em caldo, ou solidificado com aproximadamente 1% de agar é preferencial para o cultivo e isolamento do MS. Esse meio é

composto de uma base, comercialmente disponível como caldo PPLO ou meio básico para micoplasmas, no qual é adicionada a quantidade de aproximadamente 22 gramas por litro de água ultra pura. Água bi-destilada em vidro ou purificada por osmose reversa é adequada para a elaboração de caldo ou agar Frey. São também adicionados 3g/litro de glicose, 12% de soro suíno SPF previamente inativado a 56°C por 30 minutos e preferencialmente acidificado a pH 4,5 para a precipitação de proteínas com ponto isoelétrico na faixa de cultivo do MS, 0,1 g/litro de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e 0,1 g/litro de hidrocloreto de cisteína. Para o controle visual do crescimento se adiciona 2,5mL de uma solução de vermelho de fenol a 1% e ajusta-se o pH para 7,8. Esse é um meio muito rico e permite o crescimento de inúmeros outros organismos menos exigentes que MS, por isso é importante se adicionar inibidores de contaminantes, usualmente Penicilina G na concentração de 1.000.000 UI/litro e acetato de tálio na quantidade de 5 mL/litro de uma solução a 1%. Deve-se manipular o meio com rigorosa assepsia para evitar a contaminação com micoplasmas presentes na saliva ou no ar respirado pelas pessoas e outras bactérias livres no ambiente. O meio deve ser filtrado em membrana esterilizante porque o soro e outros nutrientes não podem ser autoclavados. Na elaboração de agar, a parte sólida pode ser autoclavada em separado e os demais componentes adicionados quando a temperatura baixar a aproximadamente 45°C. O acetato de tálio é um metal pesado e deve ser manuseado com cuidado, além de ser somente recomendado quando absolutamente necessário, como no caso de isolamento de MS de "swabs" traqueais, que são amostras muito contaminadas por bactérias da microbiota residente do aparelho respiratório e outras presentes na poeira do ar respirado, bem como por esporos de fungos e leveduras.

As cepas padrão de MS crescem relativamente fácil em caldo Frey quando submetidas à incubação por três a quatro dias a 37°C. Os cultivos devem ser mantidos em jarra de micro-aerobiose, na qual aproximadamente 95% do oxigênio livre é eliminado com o auxílio de uma vela incandescente. A multiplicação do MS pode ser constatada através da mudança da cor do meio do vermelho para o alaranjado e por uma pequena turvação. Em agar Frey as colônias aparecem com aproximadamente um milímetro de diâmetro, com a forma característica de "ovo frito" após cultivo por 4 a 5 dias e são melhor visualizadas com o auxílio de uma lupa ou microscópio ótico nos aumentos de 40X e 100X (Fig. 1). O MS é muito sensível ao pH ácido e deve ser repicado para novo caldo Frey tão logo seja notada a sua multiplicação. Pode-se utilizar tubos de vidro com tampa de rosca com 3mL de caldo Frey com repicagens de 0,3mL da cultura no caldo novo.

Para não se perder a viabilidade do cultivo devido à queda do pH, pode-se formular o meio com pH mais elevado, resultando em uma janela de tempo maior para a viabilidade do cultivo. O MS tem sido cultivado no laboratório da Embrapa Suínos e Aves em meio com pH inicial de 8,5, o que em virtude do armazenamento e da adição de inóculo ácido resulta em pelo menos pH 8,0 quando do início do cultivo.

Isolados de campo são especialmente difíceis de cultivar. É comum não se obter crescimento algum na primeira semana, somente havendo mudança do pH do meio na segunda ou terceira semanas de incubação. Também freqüentemente os isolados perdem a viabilidade, o que ainda permite o diagnóstico, mas não possibilita estudos adicionais com o MS isolado, como a sua comparação com outros isolados ou a sua utilização em teste de virulência. De um cultivo primário que perdeu a viabilidade, ainda se pode confirmar a presença de MS através de reação em cadeia de polimerase (PCR) da cultura, ou usando o caldo Frey cultivado como antígeno de sensibilização de placas de Elisa para a reação com anticorpos específicos.

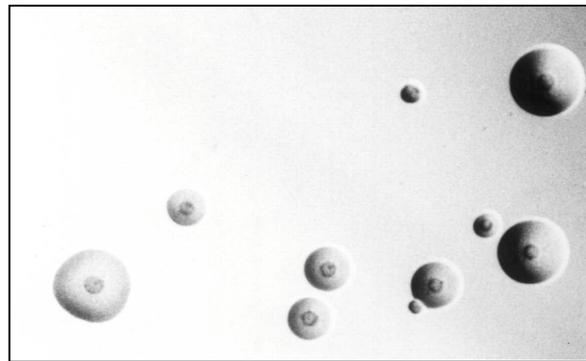


Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 1 - Colônias de *Mycoplasma synoviae* crescidas em agar Frey.

D - Patogenia

A infecção por MS ocorre preferencialmente pela via aérea. A colonização da traquéia e dos sacos aéreos é imediata e se configura na característica previsível do patógeno. A infecção sistêmica, com o comprometimento pulmonar e das articulações, entretanto, parece ter comportamento multifatorial e complexo. A colonização dos tecidos do hospedeiro tem longa duração e a completa eliminação do MS é difícil de se obter.

A transmissão vertical do MS pode atingir a 25% dos ovos produzidos na fase aguda da infecção. Porém, percentuais em torno de 5% são mais freqüentes, baixando para aproximadamente 0,5% com a cronificação do quadro. Não há indicação alguma de que a apresentação da doença em sinais e lesões apresente qualquer diferença relativa à via vertical ou horizontal de infecção. O conhecimento

detalhado dos mecanismos pelos quais um patógeno causa agressão ao hospedeiro é necessário para o estabelecimento de estratégias eficientes para o seu controle. Micoplasmas causam doenças através de mecanismos diferentes daqueles observados com a maioria das demais bactérias. Em geral, as bactérias possuem endotoxinas ou excretam exotoxinas que agredem o hospedeiro diretamente. Toxinas não são importantes na virulência dos micoplasmas, embora a excreção de enzimas como proteases e fosfolipases possam ser responsáveis por algum dano às paredes celulares do hospedeiro em virtude de sua adesão ser íntima e de forma consistente. A produção de oxigênio reativo (peróxido de hidrogênio) ao nível das membranas celulares é também um fator reconhecido como mecanismo de patogenicidade dos micoplasmas.

A evasão do sistema imunológico do hospedeiro é um item importante na patogenia dos micoplasmas. Esse é um fator que permite a perpetuação da infecção no plantel e até certo ponto, evita a sua identificação precoce por métodos sorológicos. Tem sido demonstrado através do uso de anticorpos monoclonais que alguns determinantes antigênicos superficiais são instáveis em culturas do MS. Uma colônia de MS apresenta sub- clones contendo ou não aquele determinante, exemplificando que a variação antigênica ao nível da membrana é considerável.

A latência da infecção é outro fator importante na virulência do MS. Esse é um micoplasma que pode permanecer por várias semanas na traquéia de galinhas sem que haja resposta imunológica detectável. Testes sorológicos podem falhar na detecção da infecção em função da reduzida exposição do patógeno às células de reconhecimento de antígenos. Relatos esparsos na literatura sugerem também que alguns micoplasmas fusionam sua membrana com as paredes celulares do hospedeiro e outros ainda indicam para a possibilidade de que os micoplasmas sejam patógenos intracelulares, pelo menos temporariamente. Os micoplasmas também aderem proteínas do hospedeiro em suas membranas, fazendo-se reconhecer como componentes próprios e não externos e, ainda, possuem proteínas de membrana com variações antigênicas freqüentes que permitem ao novo clone não ser reconhecido por anticorpos pré-formados.

Além da evasão do sistema imune, mesmo quando reconhecidos os micoplasmas parecem ser menos imunogênicos que outras bactérias. Micoplasmas têm genoma rico em adeninas e timidinas (A e T) em detrimento de citosinas e guaninas (C e G). Fragmentos de DNA ricos em Cs e Gs apresentam inúmeras seqüências CpG, que são estimulantes do sistema imune. Micoplasmas também não possuem lipopolissacaríde (LPS) como as bactérias Gram negativas, outro fator estimulante do sistema imune.

Embora possa ter alguma influência na dificuldade do hospedeiro em eliminar completamente os micoplasmas, essa deficiente imuno estimulação não parece interferir no diagnóstico sorológico.

Em virtude da pouca agressão direta ao hospedeiro, a patogenia de micoplasmas depende do fato de que adesinas lhes permitem fixar-se em membranas celulares, auxiliada pela variação de antígenos de superfície para evadirem-se do sistema imune do hospedeiro. Esse acaba por agredir a si próprio através de seus mecanismos de defesa, sobretudo com os produtos de excreção das células inflamatórias. A produção de Interleucina 6 e do Fator de Necrose de Tumores parece ser uma participação considerável do hospedeiro na patogenia das micoplasmoses. A contínua agressão às membranas celulares aliada à infiltração linfocitária é que resulta em doença. No aparelho respiratório, a cilioestase decorrente da inflamação também facilita o estabelecimento de infecções secundárias.

O MS possui uma hemaglutinina superficial importante para a sua virulência. Além de permitir a adesão à hemácias de galinha, essa proteína é codificada por uma família de genes e apresenta variações antigênicas na sua expressão que contribuem para a evasão do sistema imune do hospedeiro. Cada resposta imunológica a um fenótipo da adesina pode ter sua eficiência reduzida quando um novo clone do patógeno apresenta a forma variante dessa proteína em sua superfície, decorrente da expressão de um novo gene da família que codifica a hemaglutinina.

Clones hemaglutinantes de MS parecem causar sinovite mais freqüentemente do que aqueles não hemaglutinantes de uma mesma cepa. Isso indica que a hemaglutinação em si é importante para a virulência do MS ou que essa esteja, de alguma forma, ligada à fatores de virulência. Porém, o fato de que cepas não hemaglutinantes ainda podem causar sinovite, aliado à característica de variação antigênica nas hemaglutininas, não permite usar a hemaglutinação como um indicador absoluto de virulência. Além disso, não há registro de ocorrência natural de cepas não hemaglutinantes, embora esses clones possam ser selecionados no laboratório a partir de cepas hemaglutinantes e dêem uma indicação de que sua existência natural seja provável. O isolamento e caracterização de MS não é uma prática corrente em muitos laboratórios, portanto nenhuma conclusão sobre a hemaglutinação seria possível de ser feita sobre um número dilatado de amostras isoladas.

A patogenicidade de MS para embriões também varia entre cepas, conforme já identificado inclusive para amostras isoladas no Brasil. Essa observação

porém, parece nem sempre coincidir com a virulência verificada quando da inoculação em frangos. De forma geral, os experimentos utilizam ovos SPF de aves Leghorn ou frangos de corte, motivo pelo qual a extrapolação direta dos resultados não pode ser feita em virtude das diferenças entre as linhagens serem consideráveis. Ensaio de adesão a anéis de traquéia são igualmente não conclusivos quanto à sugestão de virulência da cepa. A virulência depende da invasibilidade da amostra, o que não está devidamente contemplado nos ensaios com ovos embrionados ou anéis de traquéia. A resposta do hospedeiro imunologicamente maduro também é importante na completa formação do quadro patológico.

Não existe um indicador para a virulência de MS que possa ser seguramente utilizado em um teste laboratorial simplificado. Mesmo o estabelecimento de um teste único, aceito universalmente para avaliar sua virulência parece pouco provável. A validação de um teste desta natureza seria difícil em função das diferenças na apresentação da infecção observadas em vários países. O mais recomendado ainda é a inoculação em aves SPF e o acompanhamento de lesões e da resposta sorológica, porém essa não leva em conta a participação do MS em síndromes complexas envolvendo outros patógenos, nem a participação do estresse e de fatores nutricionais ou ambientais.

Há muito de desconhecido na patogenia do MS. Alguns lotes de matrizes permanecem infectados por várias semanas sem que a detecção através de técnicas sorológicas ou o isolamento do agente sejam possíveis. Em geral, com a entrada em produção de ovos começam a aparecer aves reagentes em sorologia, possivelmente devido à evolução na apresentação da infecção da forma traqueal para a sistêmica ou do reconhecimento de antígenos mesmo em nível traqueal. Os fatores que levam a essa mudança permanecem por ser detalhadamente identificados, embora seja possível que estejam ligados à várias vacinações e ao estresse das aves no período pré-postura. Para efeitos práticos, o pico de postura é um indicador a ser utilizado como fator que aumenta a sensibilidade da detecção de MS em um lote infectado.

As vacinações para doença de Newcastle e bronquite infecciosa exacerbam a gravidade da infecção por MS, assim como ocorre com infecções respiratórias de qualquer natureza. Um lote de matrizes infectado pode, por exemplo, ter uma resposta sorológica exacerbada em função de vacinações com vírus vivos do sistema respiratório. No Brasil, a ocorrência de bronquite infecciosa é um fator complicador porque mesmo a vacinação pode ser problemática se não conduzida adequadamente.

Convém lembrar, entretanto, que estudos de fatores de risco têm demonstrado que a adoção de vacinações e medidas de higiene contribuem para a não infecção do lote por MS. A vacinação, mesmo agressiva, de um lote livre de MS, não deve, portanto, ser problemática já que o patógeno não está presente.

A existência de variações na apresentação da infecção por MS é mundialmente reconhecida. Existem doenças respiratórias acompanhadas de sinovite, das quais pode-se isolar MS bem como identificar anticorpos no líquido sinovial. Em outros casos, a infecção é aparentemente apenas respiratória. A infecção traqueal não acompanhada de resposta imunológica é freqüentemente observada em reproduções experimentais da doença ou durante a fase de latência nos casos verificados a campo.

A presença de sinovite é um achado pouco freqüente. A literatura específica carece de informações para se concluir se esta está ligada a algumas cepas de MS especificamente, ou a algum fator coadjuvante. A injeção de uma cultura de MS na almofada plantar causa sinovite em infecções experimentais, mas essa não é uma via natural de infecção. No Brasil, a sinovite causada por MS não é comum e quando ocorre em matrizes infectadas, os exames bacteriológicos das bainhas sinoviais permitem isolar apenas estafilococos, sugerindo que, na melhor das hipóteses, existe uma predisposição para essa infecção secundária nos lotes positivos para MS.

Alguns relatos têm relacionado a infecção por MS com amiloidose. Nesse quadro a lesão articular não tem a participação local do MS, mas é apenas uma manifestação anatômica de um distúrbio fisiológico. Faz-se importante ressaltar que a amiloidose é uma disfunção comum à várias doenças e não pode ser tomada como patognomônica.

Estudos têm demonstrado a ocorrência de cepas de MS com aparente baixa virulência no Brasil. Essas amostras causam infecções assintomáticas do trato respiratório apenas. Não se pode concluir diretamente que todas as amostras de MS têm igual virulência nem que todas as que ocorrem no Brasil são de baixa virulência, porém o comportamento da infecção parece similar em muitos plantéis, com a ocorrência de resposta sorológicas, porém sem a apresentação de sinais e lesões.

E - Variabilidade do agente

Como acontece com qualquer organismo, a diversidade antigênica e fenotípica também ocorre com o MS. As cepas de MS podem ser

identificadas por suas diferenças no perfil de restrição causado por nucleases ou no perfil de amplificação do DNA pelas polimerases que o sintetizam *in vitro*. Em ambos os casos, porém, se necessita isolar e adaptar o MS para cultura laboratorial e consecutivamente isolar o DNA, motivo pelo qual não são muitos os laboratórios que estão aptos a fazê-lo.

A comparação de amostras pelos perfis de restrição é permitida quando o DNA é clivado por diferentes enzimas e separado em eletroforese. A existência de seqüências de DNA, únicas reconhecidas pelas enzimas, resulta na fragmentação diferenciada do DNA. A ocorrência de muitas bandas migradas no gel dificulta a visualização de perfis únicos e essa técnica tem sido substituída pelos métodos de ampliação, que se utilizam apenas de fragmentos e não de todo o genoma para a comparação.

A comparação por ampliação baseia-se em uma variação da reação em cadeia de polimerase (PCR). Iniciadores (*primers*) não específicos são usados para a produção de vários fragmentos amplificados que são também separados em eletroforese para se obter um padrão para cada amostra. Esta técnica, denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*, Fig. 2), é bastante útil no rastreamento de cepas específicas do MS mas depende da escolha de um *primer* adequado, muitas vezes oriundo de tentativa e erro levada à exaustão para que a técnica seja eficiente. O RAPD é apropriado a estudos de epidemiologia molecular, nos quais se pode verificar a evolução de uma determinada amostra de MS em uma granja ou região. Também, através do RAPD se pode determinar se um isolado pertence a uma amostra de campo, ou é uma cepa vacinal. Uma deficiência desse método consiste em que a não demonstração de diferenças não implica necessariamente em igualdade, pois *primers* não testados poderiam eventualmente evidenciar diferenças. Perfis diferentes, no entanto, são conclusivos.

Diferenças no perfil eletroforético de proteínas também têm sido verificadas entre amostras de MS. As diferenças são observadas em bandas correspondentes à proteínas de pequeno peso molecular e, portanto, não são bons marcadores para a separação ou identificação dos isolados através da resposta sorológica do lote infectado.

Em geral, o resultado dos testes sorológicos não depende da amostra infectante, já que há reações cruzadas entre os diferentes isolados em SAR e HI. Apenas em raras ocasiões podem ser detectados lotes positivos em HI, mas negativos em SAR. Mesmo a amostra vacinal MS-H, mutante termosensível, resulta em resposta sorológica detectável em SAR quando se usa antígenos

comerciais elaborados com a amostra padrão MS WVU 1853.

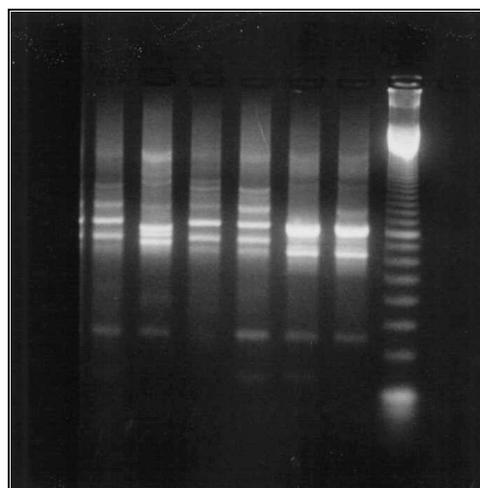


Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 2 - Gel de agarose mostrando os diferentes perfis de ampliação em RAPD obtidos com diversas amostras de *Mycoplasma synoviae*. Da esquerda para a direita estão a amostra padrão *Mycoplasma synoviae* WVU 1853, a amostra vacinal *Mycoplasma synoviae* H e isolados semelhantes entre si (colunas 2 e 3), porém diferentes dos demais (colunas 4 e 5) que, por sua vez, são também semelhantes entre si. A coluna da direita contém marcadores com intervalo de 100 pares de base.

As comparações de perfis eletroforéticos em SDS-PAGE foram freqüentes na literatura, porém a simplificação e difusão de técnicas de genética molecular conduziu as comparações para a análise de DNA preferencialmente, sendo que a análise de proteínas se tornou um fator auxiliar à análise genética, recebendo também a denominação de genômica funcional. O conjunto de proteínas possíveis de serem expressadas de um genoma, chamado proteoma, será alvo de interessantes estudos no futuro próximo, quando o genoma do MS for completamente seqüenciado.

Informações obtidas da variabilidade do MS podem ser de grande utilidade na identificação de amostras de campo e sua comparação entre si bem como de sua diferenciação de cepas vacinais, porém não fornece informação direta sobre a virulência ou capacidade de invasão do isolado. A variabilidade do MS possivelmente se reflete sobre a virulência, porém ambas não parecem estar mutuamente dependentes, pois a mesma amostra pode apresentar variações em sua patogenicidade, sendo que aquelas mais virulentas a ovos embrionados não confirmam necessariamente sua maior virulência em frangos.

F - Detecção do agente

Quando se trata de doenças infecciosas, a demonstração direta do agente é um diagnóstico

inquestionável. Essa evidência pode ser obtida com exames microbiológicos para o isolamento do patógeno, com técnicas de histoquímica que objetivam a demonstração do agente associado à lesão no tecido alterado, ou com a ampliação de seus ácidos nucleicos presentes em amostras colhidas do animal afetado. A detecção indireta da infecção é feita através da identificação de resposta imune específica, sobretudo através de técnicas sorológicas auxiliares na elucidação da causa de sinais e lesões. No caso de infecções por MS, a ausência de sinais e lesões na maioria dos casos reduz o nível de segurança das técnicas de diagnóstico indireto, tais como a sorologia. O diagnóstico, porém, permanece inquestionável se o agente for isolado, ou demonstrado através de imuno-histoquímica nas aves afetadas ou sorologicamente reativas. Recentemente foi também demonstrado que *swabs* do ambiente podem ser usados em PCR para contribuir com o diagnóstico da ocorrência de MS nos lotes.

O isolamento de MS não é uma tarefa fácil e exige boa adequação laboratorial bem como pessoal especializado. Mesmo assim, o sucesso no isolamento pode ser baixo em virtude das dificuldades em se cultivar MS *in vitro*. *Swabs* traqueais são em geral satisfatórios como amostra para pesquisa de MS, uma vez que a ocorrência de sinovite é rara e a coleta de sacos aéreos também exige a eliminação da ave. Os *swabs* devem ser obtidos em número de, no mínimo, 10 por lote para aumentar a chance de incluir pelo menos uma ave com MS viável em grande número na traquéia e que, ao mesmo tempo, não tenha excessiva contaminação por outras bactérias que irão impedir a obtenção de uma cultura do micoplasma.

A colheita à necropsia deve ser preferencial quando se pode eliminar as aves. Dessa forma, será possível uma melhor assepsia, bem como se obter *swabs* do terço inferior da traquéia (Fig. 3), normalmente menos contaminado com bactérias residentes do sistema respiratório e poeira obtida do ar. A contaminação dos *swabs* é uma importante causa de falha no isolamento de MS. Sacos aéreos são menos contaminados, porém apenas alguns *swabs* de saco aéreo permitem isolar MS. *Swabs* de articulações tendem a ser negativos, porém é recomendável colher desses locais mesmo assim porque podem dar uma indicação da preferência da amostra pelo sistema respiratório apenas ou também pelas bainhas sinoviais. Os *swabs* devem ser imersos imediatamente em caldo Frey para melhores chances de sucesso. Uma vez isolado, o MS pode ser identificado por imunofluorescência, Elisa, inibição de crescimento ou técnicas de genética molecular. Antes de estudos adicionais se recomenda clonar o isolado por três vezes.



Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 3 - Coleta de *swab* para isolamento de *Mycoplasma synoviae* do terço inferior da traquéia.

Além da adequação laboratorial já discutida, a fase em que a infecção se encontra pode ser decisiva para o sucesso ou o fracasso do isolamento. Experiências com lotes de matrizes provenientes de avós livres de micoplasmas, porém alojadas em granja endêmica, demonstraram que o isolamento é somente possível no início do ciclo de postura (26 a 28 semanas), embora os lotes já estivessem infectados há várias semanas, conforme identificado pelo PCR (Fig. 4).

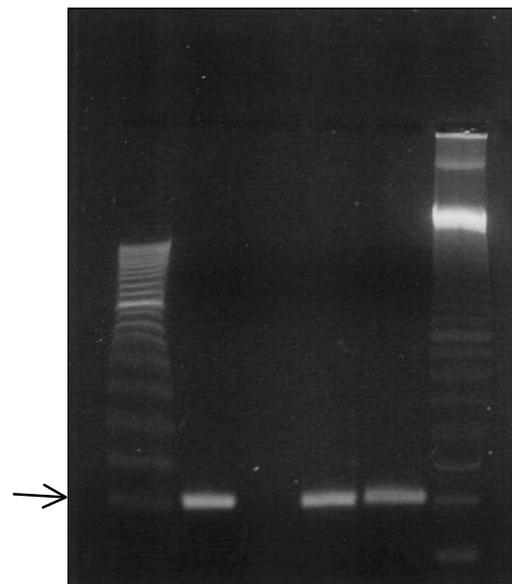


Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 4 - Gel de agarose mostrando a ampliação em PCR de fragmentos de 206 pares de bases (seta) do gene do rRNA 16S de *Mycoplasma synoviae*. As colunas 1 e 6 contêm marcadores de peso molecular, as colunas 2, 4 e 5 contêm fragmentos ampliados de *swabs* traqueais de aves positivas, enquanto a coluna 3 representa um *swab* de ave negativa.

O PCR é uma alternativa viável por representar um diagnóstico direto do agente sem várias das dificuldades verificadas nas tentativas de isolamento do MS. O resultado do PCR pode ser obtido no mesmo dia, enquanto o isolamento somente deve ser considerado como negativo após três semanas da colheita do *swab*. Lotes em tratamento antibiótico podem ser testados em PCR, enquanto o isolamento será provavelmente frustrado. Os protocolos de coleta e envio de material para PCR variam em certo grau, portanto é recomendado solicitar informações de como proceder junto ao laboratório de diagnóstico. De forma genérica, os *swabs* de traquéia são imersos em tubo descartável de plástico contendo 1ml de tampão Tris ou PBS, fervidos e enviados ao laboratório acondicionados em gelo. O PCR também pode ampliar o DNA de MS presente no ambiente, coletados em *swabs* obtidos de partículas de poeira do aviário, por exemplo. Um *swab* de traquéia é, de certa forma, um *swab* do ambiente porque coleta também as partículas aderidas ao muco traqueal, mas essa não é necessariamente uma característica negativa do teste. O diagnóstico das micoplasmoses é um diagnóstico de lote e não um diagnóstico individual. Ambientes negativos em PCR estarão certamente livres de MS. Um ponto digno de advertência é a possibilidade de resultados positivos falsos gerados pela excessiva sensibilidade do PCR. Tanto na colheita como no laboratório, o manuseio inadequado dos *swabs* pode levar a resultados enganosos, sobretudo quando material de lotes infectados e de lotes livres de MS são colhidos no mesmo dia pelas mesmas pessoas e encaminhados conjuntamente ao laboratório.

A detecção indireta do MS é feita através de técnicas sorológicas que evidenciam a resposta imune do hospedeiro. Entre estas, destaca-se a SAR, o HI (Fig. 5) e o Elisa. As técnicas de grande sensibilidade como a SAR e o Elisa são utilizadas como primeiro diagnóstico. Seu uso facilita a vigilância por indicar a negatividade do plantel com certa segurança quando uma amostragem adequada não resulta em soros positivos. Quando um grande número de amostras tem que ser testado, tanto a SAR quanto o Elisa são também adequados devido à facilidade de aplicação. Quando positivas em SAR e Elisa as mesmas amostras de soro devem ser testadas no HI devido à alta especificidade que acusa a presença de falsos positivos em SAR e Elisa aplicados anteriormente.

A detecção sorológica, porém, apresenta também seus problemas. A SAR parece ser menos sensível que o esperado, tendo sido relatado tanto na literatura brasileira como no exterior que lotes certificadamente infectados não reagiram neste teste por várias semanas. A não disponibilidade

comercial ampla do antígeno e a possível variação entre suas partidas podem ser problemas verificados algumas vezes.

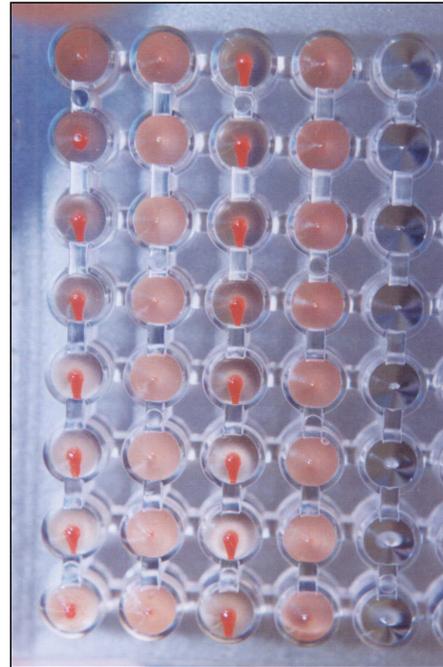


Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 5 - Inibição da hemaglutinação (HI). A primeira coluna à esquerda contém um soro com título 160, a segunda contém um soro negativo e as demais contêm controles de hemácias sem antígeno (sedimentação) e do antígeno sem soro (hemaglutinação) respectivamente.

Não é recomendado basear o diagnóstico na SAR apenas, mas também testar soros diretamente em HI pelo menos uma vez durante a fase de postura. As técnicas de HI e PCR não estão disponíveis em muitos laboratórios, e entre esses ainda pode haver certa variação como ocorre com qualquer técnica laboratorial. Recomenda-se testar amostras pareadas no tempo ou em laboratórios diferentes para dar maior solidez ao diagnóstico quando o plantel for de alto valor econômico. A Tabela 1 identifica os testes e as respectivas amostras a serem colhidas para o diagnóstico da infecção por MS.

Tabela 1. Material preferencial para o diagnóstico da infecção por MS.

Teste	Amostra
SAR	Soro fresco
HI	Soro fresco ou congelado 48 horas após a colheita
Elisa	Soro fresco ou congelado 48 horas após a colheita
Isolamento	<i>Swabs</i> do terço inferior da traquéia <i>Swabs</i> dos sacos aéreos <i>Swabs</i> da articulação articulação tibio-metatarsiana
PCR	<i>Swabs</i> da traquéia <i>Swabs</i> dos sacos aéreos <i>Swabs</i> da articulação articulação tibio-metatarsiana
Histológico	Fragmentos de traquéia, pulmão, sacos aéreos e bainhas sinoviais

G - Manifestações da infecção

Como toda infecção causada por micoplasmas, os quadros de MS são de alta morbidade e baixa mortalidade. Sinais e lesões não são facilmente detectáveis a não ser que outro agente colabore na exacerbação do quadro. Na maioria das vezes a infecção não complicada se manifesta apenas como conversão sorológica e pode passar despercebida se o lote não estiver sob vigilância através de testes laboratoriais.

A infecção por MS é em geral benigna quando não complicada por outros patógenos. O maior impacto da infecção reside no fato de atingir morbidade de praticamente 100% e durar virtualmente por toda a vida do lote, aumentando as chances de que um patógeno oportunista complique o quadro e se instale uma síndrome de maior impacto. Neste caso, as mortes advêm especialmente da septicemia causada por *E. coli*.

A infecção raramente se apresenta na forma aguda em galinhas no Brasil. Mesmo em frangos é possível a detecção da resposta sorológica não acompanhada de sinais e lesões. Nesse particular, o MS difere consideravelmente do MG, que é um patógeno primário causador de um quadro agudo que depois cronifica.

Em frangos, a infecção por MS se apresenta na forma de aerossaculite complicada na maioria das vezes. A presença de outros patógenos como a *E. coli* e o vírus da bronquite infecciosa causam lesões mais evidentes à necropsia e condenações ao abatedouro. A infecção não complicada pode passar despercebida em função da pouca extensão das lesões, mas ainda assim pode implicar na perda de desempenho do plantel. No Brasil, a ocorrência de bronquite infecciosa tem sido um fator importante no agravamento das síndromes respiratórias em frangos. Nas situações reais, a infecção por MS participa como componente de um quadro respiratório complexo, do qual também colaboram a imuno-depressão causada pela doença de Gumboro subclínica, *E. coli* e o vírus da bronquite infecciosa. A não ocorrência de doença de Newcastle, pneumovírus aviário e de laringotraqueíte, e o abate precoce de frangos, são fatores favoráveis ao não aparecimento de quadros mais complicados da infecção por MS.

A infecção por MS em aves adultas é igualmente branda quando não complicada por outros patógenos. Quadros de sinovite são raros e a aerossaculite cursa de forma assintomática, também chamada "aerossaculite silenciosa". As lesões de saco aéreo podem passar despercebidas na necropsia e mesmo a ausência de lesões não deve ser tomada como surpresa. A condição anatômica dos sacos aéreos não permite boa avaliação visual

de lesões brandas porque pequenas zonas de opacidade podem ser confundidas com manchas de tecido adiposo. Aves adultas também tendem a ter os sacos aéreos naturalmente mais densos.

O exame histológico evidencia as lesões de sacos aéreos com maior facilidade. Focos de infiltração linfocitária são facilmente reconhecidos na histologia mesmo quando essas são de difícil avaliação anatomo-patológica. A colheita dos sacos aéreos, porém, deve ser procedida de forma diligente. Se coletados em fragmentos, após fixados pela formalina essas estruturas se assemelham a restos de tecido e podem ser descartados no laboratório, motivo pelo qual se deve especificar a presença do tecido no envio da amostra. A injeção de formalina dez ou quinze minutos antes da colheita facilita a obtenção de membranas íntegras dos sacos aéreos.

O fato de que matrizes e avós são criadas em ambiente com a maior biossegurança reduz o aparecimento da aerossaculite complicada. A redução da pressão de infecção de patógenos em geral nesses ambientes, incluído o MS, colabora para que não haja manifestação clínica da infecção devido à participação de outros agentes. O isolamento da granja e dos núcleos entre si e a adoção de boas práticas de produção são todos fatores favoráveis ao menor impacto da infecção por MS em matrizes e avós.

H - Epidemiologia

A epidemiologia da infecção por MS é bem conhecida em vários aspectos. A transmissão vertical do agente, a resposta sorológica detectável quando da infecção sistêmica e o caráter endêmico quando instalado em uma granja são todos itens bem definidos em relação ao MS. Porém, algumas granjas de matrizes com um esquema de biossegurança adequado, com núcleos isolados, com controles de entrada de pessoas e que somente alojam lotes negativos para micoplasmas, aparecem repentinamente positivas para MS. Isso indica que detalhes importantes da epidemiologia dessa infecção ainda são desconhecidos.

O conceito de que micoplasmas são organismos extremamente frágeis requer um olhar crítico. Essa informação é correta quando se analisa o organismo em sua composição biológica e a sua resistência em experimentos de laboratório. Nas condições da natureza, porém, inúmeros fatores podem alterar a resistência dos micoplasmas. A permanência em contato direto com células descamadas do epitélio traqueal ou o muco ciliar expelido pelas aves infectadas, irá certamente estender a permanência do MS como célula viável no ambiente e, por consequência, sobre um vetor mecânico. Já foi demonstrado que o MS sobrevive por três dias

em penas e por dois dias no algodão, exemplificando o importante papel que o próprio ser humano pode ter na condução do MS de uma granja para outra.

Tem se verificado que a infecção de lotes livres acontece precocemente em granjas contaminadas. Experimentos que se utilizaram do isolamento e da detecção de DNA do MS através de PCR também confirmaram que a sua disseminação no ambiente é considerável, sendo que amostras de ração, água, penas, fezes e poeira colhidas na granja são positivas em ambos os testes.

Infelizmente não se dispõe de resultados que comparem granjas com diferentes práticas de produção. É previsível no entanto, que as granjas com programas de boas práticas de produção que envolvam o controle de pássaros e roedores, que controlem a disseminação de poeira e penas através de medidas de higiene e que executem desinfecções rigorosas, tenham menor pressão de infecção interna para a contaminação de núcleos ou lotes alojados livres de MS.

É possível que fatores importantes para se evitar a transmissão lateral do MS não estejam sendo levados em conta no isolamento da granja. É digno de nota o fato de que MS também infecta outras espécies de aves, além de galinhas. Entre os hospedeiros de MS se encontram perus, patos, gansos, galinha da Angola, faisões, pombos e perdizes, o que reforça a necessidade de isolamento da granja de plantéis básicos de criações dessas outras aves. A participação de pássaros silvestres como transmissores ou reservatórios de MS necessita ser esclarecida com base na ciência. O fato de se confirmar a infecção em aves silvestres, como já relatado em vários países, não implica necessariamente que esteja havendo transmissão para galinhas de exploração industrial e vice-versa. A possibilidade de que esses atuem como vetores mecânicos porém, parece altamente provável e justifica as precauções com os plantéis elite, sobretudo a adoção de tela fina e o fechamento de pequenos orifícios no aviário.

A prevalência da infecção por MS é em geral deduzida do percentual de lotes com resposta sorológica confirmada em HI sobre o total de lotes testados. Assume-se com suficiente confiança, que os lotes positivos em HI estejam infectados por MS, embora a confirmação por PCR ou isolamento do agente seja recomendável para aumentar a confiabilidade do diagnóstico. Recomenda-se também repetir o HI duas semanas após o primeiro teste para a confirmação do diagnóstico.

Os lotes infectados não são em geral eliminados sumariamente, mas, mesmo assim, são submetidos

à alguma forma de controle. Muitas vezes isso não representa um tratamento medicamentoso, mas se trata apenas de vigilância para a possibilidade do aparecimento de doença clínica. Muitos lotes infectados e assintomáticos são mantidos nas granjas, contribuindo para altas incidências sobretudo na produção de ovos de consumo, mas também em plantéis de reprodutoras de corte. Até o ano de 2002, o PNSA não dispunha de um relatório público, contendo dados de prevalência da infecção por MS no Brasil, bem como da incidência anual da infecção em reprodutoras. O *National Poultry Improvement Plan* (NPIP), dos Estados Unidos da América, tem relatado incidências de aproximadamente 4% no estrato de postura, enquanto lotes de galinhas reprodutoras de corte estão em aproximadamente 0,2% e de perus em 1,3%, para os anos de 1998 e 1999. Mesmo que essas incidências sejam aparentemente baixas, o fato desses lotes terem produzido milhares de ovos férteis entre a infecção e a confirmação do diagnóstico é um fator de preocupação.

Dados precisos da prevalência da infecção por MS são difíceis de serem obtidos. Como a infecção nem sempre se traduz em doença clínica, um sistema muito eficiente de vigilância se faz necessário para a sua detecção. O teste de PCR, que apresenta grande sensibilidade para a detecção de DNA do MS seria uma ferramenta de grande valia em estudos de prevalência da infecção, porém não está muito difundido no Brasil. Por outro lado a SAR que é de simples aplicação e tem ampla disponibilidade comercial do antígeno, às vezes apresenta sensibilidade abaixo do esperado. Os kits de Elisa têm boa sensibilidade, mas são importados e, em geral, requerem a confirmação dos soros positivos em HI. A confirmação da resposta sorológica deve ser feita com o HI que, por sua vez, também não está tão difundido como o necessário e depende de antígeno de difícil obtenção.

I - Impacto da infecção

Por ser um organismo de transmissão vertical, o MS causa impacto de ordem crescente nos extratos de produção seguintes. Por exemplo, um lote de avós poderá produzir muitos lotes de matrizes infectadas, e esses poderão produzir inúmeros lotes de frangos ou galinhas de postura infectados, estabelecendo uma projeção geométrica que justifica os investimentos no controle desse patógeno. Embora o percentual de pintos infectados pela via vertical seja baixo, a infecção se alastra facilmente no lote se nenhum tratamento for preconizado logo nos primeiros dias de vida.

Um impacto indiscutível do MS é aquele que se dá sobre o mercado de pintos e ovos férteis. O extrato comprador está, via de regra, preparado para detectar o MS através de análises sorológicas ou exame microbiológico do plantel. Pintos de um dia geralmente apresentam títulos de HI quando oriundos de um lote de matrizes infectado, os quais tendem a desaparecer na segunda semana de vida, e servem como item de vigilância para avaliação indireta do plantel do qual os ovos foram obtidos. O isolamento de MS ou PCR, por serem diagnósticos diretos, não se prestam à detecção de MS em pintos devido ao baixo percentual de transmissão que requer amostragens exageradas, mas podem ser utilizados a partir da segunda semana de vida para detectar a difusão da infecção no lote. Dessa forma, os compradores podem estabelecer com segurança se o lote obtido é livre de MS.

O impacto econômico da infecção por MS é difícil de estabelecer. Estudos com poedeiras nos Estados Unidos revelaram a redução da produção de ovos causada pela infecção por MG, porém não conseguiram identificar redução alguma nos plantéis infectados por MS. Alguns autores, porém, sugerem uma redução de até 10 ovos na postura por galinha alojada infectada por MS. Muito possivelmente, o impacto da infecção seja difícil de se estabelecer de forma inequívoca porque todas as variantes que ocorrem no campo são impossíveis de serem combinadas em experimentos científicos. Um experimento sistemático teria que contemplar inúmeros tratamentos, combinando, sobretudo, a presença ou não de cepas selvagens de vários vírus do aparelho respiratório, vacinações de diferentes intensidades com vírus do aparelho respiratório, *E. coli* com diferentes fatores de virulência, estafilococos, variações na temperatura ambiente, a presença de MG no plantel, a presença de irritantes da mucosa traqueal como a amônia e a presença de poeira e, o uso freqüente de antibióticos, entre outros. Todas essas combinações teriam que, por fim, serem testadas em combinação com diferentes amostras do próprio MS e nas diferentes linhagens disponíveis no mercado.

Como é observado com a maioria dos micoplasmas, é possível que o MS isoladamente tenha muito baixo impacto sobre a produção ou, talvez, não tenha impacto algum em determinadas situações. A latência da infecção pode se estender por muitas semanas, durante a qual não se observa nem mesmo resposta sorológica no lote. A quebra deste estado, no entanto, parece acontecer com a introdução de vacinações e estresse na pré-postura. Neste caso, o MS não teria impacto para um criador que faz apenas a recria, mas poderia ter para o produtor que adquire as aves para a produção. Outra análise necessária, em função desse ser um organismo que participa de síndromes complexas,

envolve as condições de biossegurança do plantel. Granjas de estoque genético e avós são excepcionalmente bem controladas, granjas de matrizes têm excelente biossegurança, a produção de frangos é feita com princípios básicos de biossegurança e a produção de ovos para o consumo é, geralmente, feita em granjas de múltiplas idades que não são submetidas a vazios periódicos. Nessa análise, seria óbvia a conclusão direta de que o MS teria mais impacto sobre galinhas de postura do que sobre um lote de avós infectado, não por sua habilidade em causar doença, mas por participar como adjuvante em quadros respiratórios complexos.

J - Controle da infecção

J.1. Vigilância Sanitária

O MS está presente praticamente em todos os países de importância para a avicultura. Todos esses países exercem alguma forma de vigilância para MS, conceitualmente entendida como o esforço dirigido ativamente para a identificação da ocorrência do patógeno na população sensível. Via de regra, a vigilância está associada à medidas de controle. Genericamente, além da identificação de quadros clínicos, os programas de vigilância se baseiam em repetidos testes sorológicos e tentativas de detecção direta do MS. A vigilância para o patógeno, e não para o quadro clínico, possui a vantagem de identificar também os quadros assintomáticos, além de estabelecer critérios com padronização e repetibilidade universais.

No Brasil, a vigilância oficial para MS é exercida pelo Mapa através do PNSA. Essa vigilância está regulamentada pela Instrução Normativa Nº 44, de 23 de agosto de 2001, que conceitua os diferentes estabelecimentos da produção avícola, bem como determina ações a serem seguidas para a certificação dos lotes, incluindo as exigências em biossegurança e os testes laboratoriais a serem procedidos. Os estabelecimentos avícolas de controles eventuais, como granjas de produção de ovos e frangos para o consumo humano, estão praticamente desobrigados de se submeter a um controle sistemático de MS. Esse não é um organismo que afeta o ser humano e, por ser transmitido especialmente de forma vertical, os extratos finais de produção apenas poderiam infectar lotes de mesma finalidade. Os estabelecimentos de controle permanente, definidos pelo Mapa como "granjas de seleção genética de reprodutoras primárias (linhas puras), granjas bisavozeiras, granjas avoazeiras, granjas matrizeiras, granjas de aves reprodutoras livres de patógenos específicos (SPF) e os incubatórios desses estabe-

lecimentos", que realizem comércio internacional, devem ser certificados como livres de MS. De forma resumida, a certificação é conferida pelo Mapa para lotes com resultados negativos em 100 amostras de soro testadas em SAR as 12 semanas de vida, 150 amostras testadas quando o lote atingir 5% de produção de ovos e, consecutivamente, a cada três meses, sempre, porém, efetuados em um laboratório credenciado pelo próprio Mapa.

O PNSA tem determinado o controle de MS sem a necessidade de abate dos lotes infectados nos plantéis de matrizes não envolvidos no comércio internacional. Basicamente, a vigilância oficial para MS consiste em assegurar que plantéis básicos, avós e bisavós sejam livres de MS e, em se obter informações sobre o estado da infecção em matrizes. Sua função está sobretudo em colaborar com a organização da produção avícola do país, inúmeras vezes cobrado pela transparência em relação ao estado sanitário dos plantéis. Além de demonstrar organização, que inspira confiança aos produtores internos bem como ao mercado importador, as informações acumuladas com o passar dos anos serão úteis para tomadas de decisão no futuro.

A não exigência de eliminação dos lotes de matrizes, porém, não evita completamente os problemas de transações comerciais. Os estabelecimentos que adquirem pintos de um dia ou ovos férteis, por exemplo, podem ter padrões mais rigorosos que aqueles considerados como mínimo pelo Mapa no PNSA e, talvez, não tolerem a positividade para MS. A decisão pela não erradicação do MS em matrizes foi tomada pelo Mapa, provavelmente baseada na dificuldade em se identificar claramente os prejuízos causados por MS nesse extrato da produção. É possível, entretanto, que em alguns casos a participação do MS em síndromes respiratórias ou afecções do aparelho locomotor venham a requerer medidas mais rigorosas para seu controle, o que pode incluir o abate de lotes infectados por alguns produtores, que exigiriam então equivalência de seus fornecedores.

A vigilância para MS também se justifica porque as doenças têm comportamento dinâmico. As infecções da forma benigna, que ocorrem em praticamente todo o Brasil, podem também ser uma forma de manifestação que não perdure indefinidamente. Novas cepas de MS ou patógenos secundários podem vir a desempenhar papéis importantes no estabelecimento de quadros graves ou de outra manifestação da infecção, motivo pelo qual a vigilância para MS não deve ser abandonada mesmo quando da ocorrência de quadros assintomáticos.

Convém notar as diferenças de legislação observadas entre países. O PNSA não é opcional, ou

seja, todo estabelecimento avícola que faz comércio e/ou transferência nacional e internacional de aves e ovos férteis deve obedecer à Instrução Normativa Nº 44. Mesmos os plantéis de produção de frangos e ovos para o consumo humano podem eventualmente ser submetidos à vigilância, pois estão contemplados na rubrica "estabelecimentos avícolas de controles eventuais". Nos Estados Unidos da América, por exemplo, o NPIP é de inscrição voluntária e certifica como livres de MS apenas os lotes com idade mínima de quatro meses, já submetidos aos testes sorológicos previstos sem apresentarem positividade alguma. Essas diferenças entre países devem ser levadas em conta, sobretudo quando da importação ou exportação de aves e ovos, mas, também, servem como excelente fonte de análise e autocrítica.

Outro ponto relevante é que, para efeitos de vigilância sanitária, os quadros assintomáticos têm significância pelo fato de cursarem com resposta sorológica no plantel. Essa resposta, quando detectada e confirmada por um teste de boa especificidade, como o HI, já é suficiente para a classificação do lote como infectado. A expectativa é que essa atitude deva ter a extensão positiva de que no mercado doméstico deverá causar a redução no número de lotes básicos infectados, o que, por sua vez, tende a reduzir a transmissão vertical bem como a pressão de infecção lateral.

A vigilância depende rotineiramente de testes sorológicos. A adoção de SAR apenas, entretanto, pode ser problemática. Tem sido observado que a sensibilidade dos testes pode não ser suficiente em alguns casos, sobretudo quando a invasibilidade da cepa de MS não é considerável. Mesmo o HI pode não ser plenamente satisfatório. O MS geralmente persiste de forma latente por algumas semanas, portanto nem todas as fases da infecção cursam com franca resposta sorológica. Essa situação requer um teste auxiliar para a detecção direta do agente, como a PCR ou mesmo a tentativa de isolamento, para a detecção do MS mesmo durante a fase de latência.

É possível também, que a freqüente eliminação de lotes positivos em testes sorológicos selecione, a longo prazo, amostras menos imunogênicas. Essa situação irá requerer vigilância com testes de detecção direta do agente, sobretudo a PCR. Outro aspecto que necessita ser lembrado é a característica do SAR em apresentar resultados positivos não específicos na terceira e quarta semanas após a vacinação com bacterinas oleosas. Soros previamente congelados também apresentam floculação do antígeno que se confunde com a reação antígeno-anticorpo. Soros com aparência leitosa ou com resíduo de hemólise não devem ser testados em SAR (Fig. 6).

Foto: Laurimar Fiorentin



Fig. 6 - Apenas soros com aparência amarelada e cristalina e que não foram submetidos ao congelamento (esquerda) devem ser submetidos à soroaglutinação rápida. Soros com aparência leitosa indicativa de contaminação bacteriana ou lipídeos (centro) bem como aqueles com resíduos de hemólise (direita) devem ser descartados.

A vigilância ideal é aquela que obtém a identificação precoce da infecção em uma população livre de MS. No caso de MS, essa tem a real função de demonstrar que os lotes, ou a granja, permanecem livres do patógeno. A manutenção de lotes livres de MS, no entanto, não é simples de ser obtida em uma região endêmica, e a vigilância por região não é praticada no caso de MS. Tem sido demonstrado que a capacidade de transmissão lateral e a resistência do MS no ambiente é maior do que o inicialmente determinado, e exames de PCR indicam contaminação ambiental de grande extensão em uma granja positiva. As dificuldades para a contenção do organismo em áreas endêmicas e a falta de identificação clara de seu impacto sobre a produção tendem a fazer do MS um patógeno “aceitável” para os produtores. Essa atitude é confortável, enquanto o impacto da infecção tiver os padrões atuais, mas não garante a ausência de problemas no futuro, nem elimina a possibilidade de se ter que revisar a vigilância na eventualidade da alteração nos padrões da infecção.

Alguns mercados têm exigido a comprovação de negatividade para MS em frangos. O MS não é um organismo que afeta diretamente a segurança alimentar e, portanto, essa atitude visa proteger os plantéis avícolas dos países importadores. Sob a luz da informação disponível na literatura, o MS não é um organismo que resiste bem aos agentes físicos empregados no abate de frangos como o escaldamento e, depois, a congelação. O próprio tempo de armazenagem de várias semanas é desfavorável à viabilidade do organismo. Finalmente, a infecção por MS não é um problema que afeta frangos, especialmente aqueles abatidos precocemente. A possibilidade, portanto, da transmissão de MS através de carcaças congeladas de frango parece pouco provável. É necessário recordar que a

Office International des Epizooties (OIE) não lista MS entre os organismos sugeridos para o controle transnacional.

A vigilância para MS deve também ser vista como uma forma de benefício ao comércio. A clara demonstração de negatividade para MS, é uma proteção contra o uso do organismo como fator de rejeição de aves vivas ou até de carne de frangos, no caso de compradores que exigirem equivalência. A obtenção de resultados negativos, porém, é muitas vezes questionável enquanto a demonstração dos positivos é axiomática. A negatividade de um plantel testado com base em amostragens somente pode ser concluída através de repetidos e diferentes testes aplicados com o passar do tempo, sempre se utilizando de metodologia de aceitação internacional. Conceitualmente, a positividade de um plantel é demonstrada enquanto a negatividade é inferida.

A realização de testes pelas próprias empresas não deve ser entretanto desencorajada. Isso permite a obtenção de padrões internos formados ao longo dos anos, que facilitam a aplicação das políticas de controle de micoplasma devido à homogeneidade da informação entre as diferentes granjas ou subsidiárias de uma empresa. A sua validade para terceiros fica, porém, sujeita a questionamentos pela falta da validação externa. As empresas que decidem conduzir seus próprios testes em plantéis de controles eventuais pelo PNSA, como frangos, devem eventualmente solicitar a comprovação dos resultados em outros laboratórios para sua maior segurança.

Um grande desafio da vigilância, para efeito interno na empresa avícola, consiste em prever se uma infecção por MS vai resultar em sinovite ou apenas em aerossaculite silenciosa. Essa informação poderia ser de grande utilidade nas tomadas de decisão para se antecipar aos problemas de saúde animal na produção, sobretudo com o emprego de antibióticos quando estritamente necessário e já nos primeiros dias de vida. A progênie de plantéis infectados com amostras de MS que, possivelmente, causem apenas quadros de aerossaculite, deverá ter cuidados especiais para não apresentar outra afecção concorrente no aparelho respiratório, enquanto pintos, possivelmente infectados com amostra que causa sinovite, necessitam cuidados especiais quanto à fatores que causam síndromes do aparelho locomotor, como a presença de Reovirus, por exemplo, bem como poderiam ser abatidos mais leves. Essa divisão, porém, parece não ser perfeita, ou pelo menos as pesquisas na área parecem não oferecer subsídios para uma definição clara. Também, os fatores que permitem a uma mesma cepa de MS progredir para a infecção sistêmica, se isso ocorre, não estão identificados. Na prática,

esta vigilância consiste em identificar a conversão sorológica e depois proceder inspeções rigorosas para a identificação de possíveis quadros complicados de aerossaculite ou sinovite e proceder antibioticoterapia se necessário.

Uma forma indireta de vigilância para MS consiste em se diagnosticar diligentemente os síndromes respiratórias e problemas do aparelho locomotor. Especialmente o aparelho locomotor sofre influências de fatores infecciosos, nutricionais e de manejo, combinados de forma que seguidamente mascaram a real causa primária do problema. A solicitação de exames histológicos freqüentes dos tecidos articulares auxilia na elucidação de síndromes complexas por indicar possíveis causas a serem confirmadas com exames adicionais.

A vigilância para MS realmente necessária na atualidade consiste em se identificar possíveis alterações no comportamento da infecção. O aparecimento de quadros abertos, com sinais e lesões francamente causados pelo MS seria preocupante. O aparecimento desses quadros parece pouco provável porque a extensa resposta sorológica dos plantéis de produção de ovos, e de matrizes até certo ponto, devem estar exercendo a exclusão de cepas mais virulentas do MS. A eventualidade de sua ocorrência, entretanto, iria provocar uma revisão profunda nos conceitos sobre a infecção por MS em galinhas no Brasil.

J.2. Tratamento

O tratamento medicamentoso da infecção por MS em galinhas de exploração industrial se baseia na administração de antibióticos. Métodos alternativos têm também sido experimentados na criação industrial, como o aquecimento de ovos incubáveis que visa a redução da contaminação interna.

O uso de antibióticos de forma preventiva tem sido relatado como vantajoso em lotes de pintos obtidos de ovos oriundos de plantéis infectados. Preferencialmente se trata os pintos nos primeiros cinco dias de vida com o objetivo de retardar o alastramento da infecção no lote, o qual poderá então ser abatido com incidência mínima de soroconversão ou eventualmente de lesões. O tratamento antibiótico ainda pode ser preconizado após a instalação generalizada da infecção, porém seus resultados tendem a ser menos satisfatórios. Normalmente, a decisão de se usar ou não antibióticos depende de uma criteriosa avaliação do impacto que a infecção está tendo em síndromes respiratórias complexas. Na maioria dos casos, se utiliza um antibiótico que tenha ação também sobre as bactérias concorrentes na infecção, como a *E. coli*, por exemplo.

Vários antibióticos são efetivos no tratamento da infecção por MS. Entre estes estão a espectinomicina, as quinolonas, as tetraciclinas, a tiamulina e a tilosina com seus derivados. Nenhum tratamento antibiótico, no entanto, deve ser visto como a solução única e definitiva para o MS. O tratamento feito nos primeiros dias de vida, quando possível, deve ser aliado ao abate precoce e ao controle adequado da bronquite infecciosa ou outra doença infecciosa que esteja ocorrendo. O tratamento preventivo é somente recomendado quando pintos são obtidos de matrizes infectadas que tenham produzido repetidamente lotes com síndromes respiratórias com o envolvimento de MS. O uso profilático de antibióticos deve ser evitado, a não ser que sua utilização futura no mesmo lote seja inevitável quando não usado preventivamente.

O tratamento de matrizes com antibióticos tem sido utilizado na forma de pulsos mensais que mantêm a transmissão vertical do MS em níveis muito baixos. Esse sistema tem sido também recomendado para a obtenção de pintos livres de MS por incubação dos ovos colhidos no período em que o efeito do antibiótico é máximo. A eliminação do MS no plantel utilizando-se apenas antibióticos deve, porém, ser vista com cautela. O MS é um organismo propenso a infecção latente e a eliminação do MS nunca pode ser tomada como certa enquanto o lote ainda estiver sendo tratado. Mesmo quando as aves deixam de reagir em um teste sorológico não significa que o ambiente esteja livre do MS. Nós temos testemunhado um caso de comprovada eliminação de MS em plantel de matrizes submetido a intenso tratamento antibiótico destinado a controlar *E. coli*. As doses utilizadas, entretanto, foram altas e repetidas e a granja havia sido completamente depopulada antes da introdução do lote, reduzindo a pressão de infecção ambiental. O uso de antibióticos como parte de um programa integrado de controle pode, portanto, ser vantajoso se acompanhado de melhorias na biossegurança do plantel.

O uso diligente dos antibióticos deve ser reforçado. Micoplasmas não são bactérias com propensão ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos a campo, e mesmo antibióticos com muitos anos de uso como as tetraciclinas e a tilosina continuam a apresentar resultados satisfatórios. Micoplasmas não possuem plasmídeos que conferem resistência aos antibióticos por transmissão lateral de genes e dependem apenas da seleção de mutantes ao nível cromossômico. Porém, já foi demonstrado em laboratório a capacidade dos micoplasmas aviários em desenvolverem resistência a vários antibióticos.

É necessário lembrar também que as políticas de redução dos resíduos em carnes são abrangentes e

aplicadas em todos os países, pressionando para a redução do uso de antimicrobianos em animais e para a sua utilização apenas quando absolutamente necessário, ainda se observando as dosagens recomendadas e o período de carência antes do abate.

Alguns tratamentos de ovos têm sido avaliados e usados em escala piloto. Embora apresentem eficiência na redução do percentual de ovos contaminados, e conseqüentemente de pintos infectados, não são tratamentos compatíveis com a larga escala praticada na avicultura industrial. Ovos férteis podem ser imersos em solução de antibióticos, injectados com antibióticos ou submetidos à temperatura de 46°C para inativar os micoplasmas. Via de regra, a eclodibilidade é bastante afetada e o tratamento apresenta custo elevado e pouca praticabilidade para ser utilizado como forma rotineira de controle do MS. Essa prática, entretanto, tem sua validade reconhecida em programas de erradicação de MS na progênie.

J.3. Vacinas

Existem várias bacterinas de MS para uso em galinhas. Em geral, as bacterinas devem ser aplicadas na recria para que as aves cheguem à granja de produção já imunizadas. Essas vacinas, porém, têm a desvantagem de interferirem com a vigilância da infecção através de testes sorológicos, motivo pelo qual o PNSA não recomenda a vacinação de lotes de reprodutoras. Os lotes de controle apenas eventuais, como as galinhas de postura de ovos comerciais, podem usar a vacina, porém essas devem ser reservadas para granjas endêmicas ou nas quais o controle através de biossegurança não é confiável, novamente de posse da indicação de que essa trará benefícios à produção.

Recentemente tornou-se disponível uma vacina viva, mutante termo-sensitiva atenuada para MS (cepa MS-H). Essa cepa vacinal foi desenvolvida a partir de um isolado australiano obtido da fenda palatina de uma poedeira com sinais respiratórios, submetido à mutagênese química e à seleção de clones com maior habilidade de multiplicação a 33°C que a 39,5°C. Essa característica permite a colonização das vias aéreas superiores, nas quais a temperatura é inferior e o conseqüente desenvolvimento de resposta imune. Essa vacina é usada na Austrália e no México e ainda não está sendo utilizada no Brasil, mas poderá ser um importante item do controle de MS no futuro. A sua utilização em larga escala, entretanto, está na dependência de melhor esclarecimento do real impacto de diferentes cepas de MS em patologias que afetam as aves de plantéis básicos no Brasil, do efeito protetor da vacina contra essas cepas e de sua relação custo-benefício. Na Austrália, seu país de origem, os produtores de ovos para o consumo utilizam rotineiramente a vacina MS-H conjuntamente com a MG ts-11, também mutante termo-sensitiva atenuada, no controle de micoplasmas em poedeiras. A vacinação com MS-H também causa interferência com a SAR em certo grau, o que deve ser considerado na decisão pelo seu uso.

J.4. Erradicação

A erradicação de MS pode ser obtida de um plantel ou uma granja. Existem metodologias eficientes para ambas as situações, porém cada caso deve ser estudado independentemente quanto ao emprego de métodos que possam ter maior eficiência naquele particular. Via de regra, se aplica uma combinação de imunoterapia, antibioticoterapia e itens de biossegurança para a obtenção de lotes livres de MS a partir de um plantel infectado.

A erradicação de MS é possível de ser obtida mas requer um estudo minucioso da relação custo-benefício em cada plantel ou granja. Essa somente será viável quando o plantel ou a granja livre de MS for imprescindível. Em função de seu alto custo e do tempo necessário para sua obtenção, não se recomenda erradicar MS de um plantel do qual a empresa possui uma réplica equivalente, porém livre de MS, que poderia ser expandido. O valor do plantel em questão deve ser também levado em conta, sendo em geral viável a erradicação apenas em plantéis básicos de formação de linhagens ou estoques genéticos com fins científicos. A erradicação de MS de matrizes obtidas de avós livres de micoplasmas somente faz sentido quando inserido no programa de erradicação de MS da granja. Também, não seria lucrativo erradicar MS de uma granja que não possui os itens básicos de biossegurança necessários para se evitar a recontaminação, ou se não for possível se obter um novo plantel certificadamente livre de MS para substituí-lo. Essas observações fazem sentido na luz do conhecimento atual, porém é provável que no futuro algumas metodologias de erradicação de MS sejam simplificadas sem perder a eficiência e poderão ser aplicadas em larga escala em lotes de matrizes, especialmente com o uso diligente de antibióticos.

Várias questões devem ser respondidas antes de se decidir por erradicar o MS. Inicialmente, deve-se certificar que o lote esteja realmente infectado. Embora essa pareça uma questão demasiadamente básica, muitas situações de diagnósticos falsos acontecem devido a não aplicação correta das técnicas de sorologia ou a não disponibilidade de uma técnica para o diagnóstico definitivo. Jamais se deve basear o diagnóstico em SAR apenas, e mesmo quando a positividade do lote for confirmada em HI deve-se repetir o teste duas semanas após para confirmação. Quando a possibilidade de um falso resultado positivo for irrefutavelmente afastada, deve-se isolar o MS infectante da granja para futuros estudos. Esses podem não ser imprescindíveis, mas irão dar sustentação ao trabalho de erradicação. É de grande importância saber o perfil de sensibilidade da amostra de MS aos diferentes antibióticos que podem ser utilizados, e se possível obter as MICs (concentração inibitória mínima) para cada antibiótico que poderá ser utilizado e para cada isolado de MS. Alguma identidade da amostra deve ser estabelecida para auxiliar na sua identificação quando de novos

isolamentos na granja. Em geral, técnicas de genética molecular são adequadas para estabelecer essa identidade e são baseadas em ampliação do DNA baseado em PCR ou a sua análise com enzimas de restrição específicas. O isolamento da mesma cepa de MS indica que o programa de erradicação não está sendo eficiente, enquanto o isolamento de outras cepas revela falhas no sistema de biossegurança.

Uma segunda questão a ser respondida é se a empresa tem estrutura laboratorial para apoiar os trabalhos de erradicação. O sucesso ou não da erradicação de MS deve ser avaliado sem possibilidade de erro e a dependência de uma fonte externa será contrária à praticidade necessária para o processo. O exame de HI, pelo menos, deve estar à disposição no laboratório da empresa para aplicação imediata em amostras positivas na SAR. A eliminação precoce e acertada de um grupo de aves positivas, seguido de isolamento do núcleo, pode salvar todo o programa de erradicação.

A questão final e definitiva é quanto a viabilidade de se tentar erradicar o MS. Em virtude da complexidade dos trabalhos, somente plantéis insubstituíveis devem ser submetidos à erradicação de MS. Esses são linhas puras ou outros plantéis usados na formação de linhagens. Quanto à granja, a decisão muitas vezes envolve apenas a depopulação seguida de vazio e repopulação com aves livres de MS, mas esta decisão depende da possibilidade de se mantê-la com lotes não infectados no futuro. Nesse particular, será necessário avaliar desde a disponibilidade de pintos de um dia certificadamente livres de micoplasmas até o controle de vetores como pássaros e roedores.

A erradicação deve ser baseada na progênie sempre que possível. A erradicação de MS nas aves adultas deve ser evitada porque suas chances de sucesso

são menores. A escolha do plantel também é fundamental, dando-se preferência a aves com idade avançada e que estejam com baixa pressão de infecção lateral. Esse é um índice subjetivo e de difícil avaliação, mas pode-se ter uma idéia através da idade em que lotes novos soroconvertem, da presença ou não de sinais e lesões de MS e infecções concorrentes do trato respiratório e do número de soros positivos por amostragem obtida do plantel. Antes da obtenção dos ovos, as galinhas devem ser tratadas com um antibiótico para reduzir a transmissão vertical do MS e os ovos obtidos devem ser também submetidos a um tratamento adicional com imersão ou injeção de antibiótico. Os ovos devem ser incubados em grupos isolados por incubadora. Cada grupo de ovos irá produzir um grupo de aves a ser criado isoladamente dos demais em ambiente livre de MS e testado em sorologia, PCR e tentativas de isolamento de MS a cada quatro semanas. Cada grupo que positivar deve ser eliminado. Os grupos negativos devem ser mantidos em isolamento até o pico de produção de ovos, pelo menos, quando a maioria dos lotes latentes para MS apresentam a infecção de forma detectável em todos os testes. Resultados negativos nos testes da progênie não representam necessariamente a erradicação do MS. Níveis muito baixos de infecção podem resultar em negatividade devido a não contemplação de amostras positivas na amostragem. Além disso, especialmente a SAR tem sido relatada com sensibilidade abaixo do esperado.

Um esquema básico para o programa de erradicação consiste em: a) selecionar um grupo de poedeiras no final do ciclo de postura; b) imunizar o lote e tratar as aves com antibiótico; c) selecionar ovos férteis de boa qualidade e tratar com antibiótico; d) alojar as aves em grupos isolados em ambiente livre de MS; e) manter o ambiente em boa biossegurança.

Referências Bibliográficas

- BRASIL. Instrução Normativa nº44 de 23 de agosto de 2001. Anexo: 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] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.163, 24 ago. 2001.
- FIORENTIN, L. A significância das infecções assintomáticas de *Mycoplasma synoviae*. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2., 2001, Chapecó, SC. *Anais ... Chapecó: Sociedade Catarinense de Medicina Veterinária*, 2001. p.104-108.
- FIORENTIN, L. Recentes avanços no controle das micoplasmoses. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2., 2000, Santa Maria, RS. *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2000. p.50-54.
- FIORENTIN, L.; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; ANTUNES, S.C.; COSTA, J.L.A. da; SONCINI, R.A.; VIEIRA, N.D. Comportamento da infecção por *Mycoplasma synoviae* em matrizes de corte introduzidas em granja com histórico de positividade. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, n.4, p.122, 2002. Suplemento.
- KLEVEN, S.H. *Mycoplasma synoviae* infection. In: CALNEK, B. W. *Diseases of poultry*, 10.ed. Iowa: Iowa State University Press, 1988. p.220-228.
- OLSON, N.O.; BLETNER, J.K.; SHELTON, D.C.; MUNRO, D.A.; ANDERSON, G.C. Enlarged joint condition in poultry caused by an infectious agent. *Poultry Science*, v.33, p. 1075, 1954. Resumo.

Circular Técnica, 31

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Endereço: Br 153, Km 110,
Vila Tamanduá, Caixa postal 21,
89700-000, Concórdia, SC
Fone: 49 4428555
Fax: 49 4428559
E-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2002): tiragem: 300

Comitê de Publicações

Presidente: Paulo Roberto Souza da Silveira
Membros: Paulo Antônio Rabenschlag de Brum, Jean Carlos Porto Vilas Bôas Souza, Janice Reis Ciacci Zanella, Gustavo J.M.M. de Lima e Julio Cesar P. Palhares. **Suplente:** Cícero Juliano Monticelli.

Revisores Técnicos

Liana Brentano, Cícero Juliano Monticelli e Fátima R.F. Jaenisch.

Expediente

Tratamento Editorial: Tânia M.B. Celant.
Revisão gramatical: Tânia M.G. Scolari.
Normalização bibliográfica: Irene Z.P. Camera.