

Concórdia, SC
Janeiro, 2004

Autor

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



O *Mycoplasma synoviae* em Galinhas Comerciais

II. Contribuições da Embrapa Suínos e Aves

1 - Introdução

O *Mycoplasma synoviae* (MS) tem sido uma preocupação constante para os produtores avícolas. O impacto da infecção não aparece de forma muito evidente sobre a produtividade, porém devido ao fato do MS ser objetivo da vigilância oficial do país tem se criado a necessidade de manutenção de plantéis de linhas puras e avós livres deste patógeno além da não ocorrência da doença clinicamente visível. Mesmo em matrizes, plantéis em que atualmente a vigilância tolera a infecção por MS desde que ovos férteis e aves vivas sejam comercializados no mercado interno apenas, alguns produtores notam melhor produtividade da progênie oriunda de aves livres do micoplasma, sobretudo quando se trata de frangos de abate criados em zonas endêmicas para bronquite infecciosa ou outro quadro respiratório. Ainda que estas observações sejam de cunho prático e carecem de rigor científico, a melhora no desempenho verificada na produção, associada ao estado de livre de MS estimula a erradicação do patógeno nas matrizes. Infelizmente, nem a manutenção de granjas livres de MS nem a sua erradicação são tarefas fáceis de serem atingidas, forçando os produtores à convivência com a infecção quando permitido, devido à falta de opções viáveis para a sua eliminação.

Para o comércio internacional de aves e ovos férteis, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) exige que os plantéis, mesmo de matrizes, sejam livres de MS. Com o aquecimento do mercado latino para ovos férteis e pintos de um dia ocorrido nos últimos anos, a criação de matrizes livres de MS passou a ser melhor considerada. Muitos matrizeiros tiveram que sofisticar a vigilância para MS, o que representou adotar as técnicas não utilizadas até então, como a inibição da hemaglutinação (HI) e a reação em cadeia de polimerase (PCR), os quais ainda não estão largamente difundidos no país.



Foto: Laurimar Fiorentin

O controle de MS requer adequação laboratorial e pessoal especializado. Testes fáceis de serem aplicados, como a soroaglutinação rápida (SAR) não são via de regra conclusivos, ainda que possam indicar a infecção com boa confiabilidade quando a frequência de reagentes é alta e confirmada em repetições efetuadas com intervalos de algumas semanas. Os testes de HI e PCR são de resultado geralmente definitivos mas requerem certa sofisticação laboratorial. O teste de Elisa é de boa utilidade para a avaliação de grande número de soros em triagem e para aplicação associada ao HI, mas requer também adequação laboratorial além de ter custo mais elevado que a SAR. Estas dificuldades fazem com que a vigilância para MS seja menos aplicada do que seria o recomendado, exigindo da pesquisa esforços para a sua simplificação sem perda de eficiência, facilitando sua maior difusão. Ainda, há a necessidade de maior difusão dos conceitos referentes à infecção por MS, assim como treinamento do pessoal encarregado de condução dos testes nas empresas avícolas e de uma discussão abrangente sobre a real importância do MS caso a caso.

Mesmo de posse de confirmação laboratorial inquestionável, a infecção por MS permanece como um problema de decisão estratégica. O impacto da infecção é difícil de ser mensurado, sua epidemiologia contém pontos obscuros e a interação com outras doenças nem sempre é clara. Mesmo quando da ocorrência de MS em frangos ou poedeiras comerciais, o controle das infecções secundárias faz muitas vezes com que a produtividade seja satisfatória, resultando em questões fundamentais sobre a real importância deste micoplasma em alguns estratos da produção. A pesquisa se vê, novamente, na obrigação de fornecer subsídios para o esclarecimento da importância do MS, evitando assim que produtores tenham perdas ocultas que não consigam atribuir ao micoplasma, ou que eliminem lotes infectados sem necessidade. Por outro lado, é também necessário esclarecer se a convivência com MS não resulta em perdas excessivas com tratamentos para infecções secundárias e queda direta na produtividade, estimulando assim sua erradicação.

Devido às características de endemia, a infecção por MS é difícil de ser eliminada. Além disso, requer esforços financeiros sobretudo para melhorar a biossegurança da granja, evitando-se assim nova contaminação. A biossegurança perfeita, porém, requer informações detalhadas sobre as formas de transmissão do patógeno, as quais nem sempre estão disponíveis para a tomada de decisão no caso de MS. Com base neste panorama complexo exposto acima é que a Embrapa Suínos e Aves mantém uma linha de pesquisa em MS.

Em 1984, o então Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MARA) adquiriu a Granja Guanabara. Naquele momento, este movimento foi tomado como estratégico porque esta era a única empresa brasileira que mantinha um programa de seleção de linhagens de galinhas, com 2 linhas puras para corte e 5 para postura, alojadas nos municípios de Itaipava e Pirai, no estado do Rio de Janeiro. O MARA passou então a gerência da Granja Guanabara para a Embrapa Suínos e Aves, ainda denominada Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), para a posterior incorporação do plantel da Granja Guanabara ao programa de melhoramento genético de galinhas iniciado pela Embrapa em 1983. Um inventário executado então sobre a saúde do plantel constatou a contaminação por ambos MS e *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e exigiu que a Embrapa Suínos e Aves estabelecesse definitivamente estruturas laboratorial e de pessoal para trabalhar com micoplasmas aviários. Além do trabalho de erradicação de micoplasmas no plantel adquirido da Granja Guanabara, as pesquisas evoluíram para os estudos de epidemiologia e controle de MS estimuladas pelo estabelecimento do Plano Nacional de Sanidade Avícola, em 1994, o qual enquadrava definitivamente a infecção por micoplasmas em plantéis básicos como uma obrigação dos produtores e da vigilância oficial do país.

Esta publicação contém uma compilação dos principais resultados de pesquisas obtidos pela Embrapa Suínos e Aves em sua linha de pesquisa com MS nos anos recentes. Uma discussão mais abrangente é realizada em certos pontos para inserir estes resultados na

perspectiva atual e avaliar a longevidade das informações produzidas. Finalmente, quando necessário, estes resultados são inseridos em projeções para o futuro do controle de MS em plantéis de avós e matrizes.

Em virtude da complexidade do tema e da apresentação apenas de resultados obtidos pela Embrapa Suínos e Aves, os assuntos não podem ser esgotados nem soluções simples podem ser apresentadas. Entretanto, este documento servirá como importante subsídio para a formação de pessoal e para a elaboração de programas de controle de MS adaptados caso a caso, além de incitar discussão genérica sobre o tema. Outra publicação complementar, a Circular Técnica número 31 da Embrapa Suínos e Aves sob o título “O *Mycoplasma synoviae* em galinhas comerciais. I. O diagnóstico e o controle em perspectiva”, deve ser lida preferencialmente anterior a esta para maior compreensão do assunto.

2. Epidemiologia de MS em granjas de matrizes pesadas

O controle de qualquer infecção é facilitado pela identificação de suas características como epidemia. A identificação das formas de transmissão, dos reservatórios do agente e de sua abrangência geográfica são imprescindíveis para se estabelecer medidas de contenção. No caso das micoplasmoses, o comportamento de diferentes micoplasmas como MG e MS, diferem consideravelmente mesmo quando infectantes do mesmo hospedeiro. O comportamento das infecções nos diferentes estratos da produção também difere, sobretudo dependendo da sensibilidade das aves, das características da produção e da presença de outros patógenos, fazendo com que o estudo caso a caso seja necessário.

A epidemiologia das infecções causadas por MS em galinhas requer investigação detalhada. Especialmente em matrizes pesadas, a contaminação do plantel ocorre muitas vezes sem que a fonte da infecção possa ser identificada. Observações práticas sugerem que a positividade em testes sorológicos aparece com a entrada das aves em postura, porém o momento exato da infecção e a sua origem são difíceis de serem estabelecidas, gerando

questionamentos quanto às possibilidades da transmissão vertical ter permanecido latente ou da infecção lateral no lote introduzido. Outro fator que merece a atenção é a ocorrência de MS em granjas com bom nível de biossegurança sem histórico recente da infecção. Conhecimento detalhado do comportamento desta infecção é imprescindível para se estabelecer estratégias a evitar a contaminação de granjas livres, a infecção de lotes livres de MS introduzidos em granjas contaminadas e finalmente para a redução do impacto da infecção instalada.

A vigilância para MS requer testes sensíveis e específicos. Como esta é uma infecção que cursa sem sinais clínicos em matrizes na maioria das vezes, o uso de testes laboratoriais é imprescindível. Estes, porém, devem não apenas serem eficientes como técnicas laboratoriais mas também serem empregados na forma adequada. O momento exato de se usar cada teste no plantel também depende de se conhecer as características da infecção que se quer detectar, sob o risco de se aplicar o teste certo no momento errado, por exemplo, ou com uma amostragem definida sem base na prevalência provável da infecção na população ou com baixo índice de confiabilidade.

Trabalhos por nós conduzidos sugerem que a infecção por MS em matrizes de corte introduzidas em granjas endêmicas obedece a um perfil definido. Há a previsibilidade de infecção das aves durante a recria e a ausência de sinais e lesões, porém a detecção laboratorial é facilitada nas semanas de início da produção de ovos. Estes resultados podem ser importantes para definirem estratégias de controle tanto no âmbito das empresas avícolas quanto para o controle oficial de MS no país. Estas observações permitem melhor direcionamento da vigilância, bem como maior confiabilidade aos resultados negativos aplicados nos momentos críticos para a detecção da infecção. Os resultados positivos são geralmente conclusivos, mas aqueles negativos sempre deixam dúvidas entre a real negatividade, a condução deficiente dos testes no laboratório ou aplicação do teste em um momento errado. Os resultados negativos, entretanto, são utilizados como base para se comprovar o estado de livre de MS em um plantel e não podem ser de baixa confiabilidade.

Em um dos experimentos conduzidos, três lotes de aproximadamente 12 mil matrizes de corte foram obtidos de avós negativas para MS e MG. As aves foram criadas até a 21ª semana de vida em granja de recria com histórico da infecção por MS, quando foram então transferidas para duas outras granjas de produção também com histórico da infecção nos anos recentes. Além da vigilância rotineira para a detecção de problemas clínicos, 20 ou 30 amostras de sangue e duplicatas de 10 suabes traqueais foram coletados de cada lote em intervalos de aproximadamente 6 a 8 semanas. Os soros foram testados em SAR e HI enquanto que os suabes foram submetidos a PCR e tentativas de isolamento do MS. As colheitas foram mantidas até que todos os testes resultassem em positividade inequívoca, adicionado de uma colheita de confirmação 6 a 8 semanas após.

Nenhum quadro clínico foi observado nas matrizes durante todo o experimento. Entretanto, todos os três lotes positivaram em ambos SAR, HI e PCR para MS até o incremento na produção de ovos, entre 22 e 32 semanas de idade. A resposta sorológica, porém, foi detectada tardiamente pela SAR em dois lotes (Tabela 1). Isto indica que a sensibilidade da SAR está abaixo do esperado para o teste e deve ser vista com cautela quando do estabelecimento de um programa de vigilância para MS. Este resultado sugere que a vigilância para MS não deve ser baseada somente em SAR mas que seja auxiliada por PCR e tentativas de isolamento do agente.

Tabela 1. Idade dos lotes em semanas quando da positividade para MS nos diferentes testes.

Lote	PCR	Isolamento	SAR	HI
31/01	27	27	22	27
53/00	11	27	32	32
59/00	22	28	22	33

O isolamento de MS somente foi obtido entre a 27ª e a 28ª semanas de idade. Esta observação sugere que o insucesso no isolamento de micoplasmas pode estar influenciado por fatores geralmente não considerados. Aves submetidas a níveis menores de estresse e produtividade, como aqueles verificados durante a cria e recria, possivelmente mantém a infecção traqueal por MS de forma latente. Quando submetidas ao estresse de manejo e

vacinações da pré-postura e o início da produção de ovos, a infecção possivelmente se torna aguda e o número de micoplasmas viáveis na traquéia aumenta, facilitando seu isolamento em meios sintéticos. De forma genérica, esta observação indica para a necessidade de se aguardar até o pico de produção para se ter certeza da negatividade de um lote para MS se testes laboratoriais sensíveis como a PCR não estejam disponíveis. Em caso de dúvidas devido a resultados conflitantes, se pode esperar até o pico de produção para se proceder tentativas de isolamento do MS, quando as chances de sucesso são maiores.

O isolamento de MS não correspondeu perfeitamente aos resultados da sorologia. Um lote (53/00) permitiu o isolamento de MS às 27 semanas enquanto os exames sorológicos somente foram positivos às 32 semanas de idade. Outro lote reagente em sorologia às 22 semanas (59/00) somente resultou em isolamento de MS às 28 semanas de idade. Essas observações são importante para se reavaliar a prática de tentativa de isolamento de MS utilizada somente quando da positividade em sorologia, uma vez que aves já infectadas podem demorar várias semanas para positivarem sorologicamente. Problemas com a baixa sensibilidade da SAR têm sido relatados com frequência. Embora esta seja uma técnica delineada para ser sensível por detectar eficientemente IgM, a imunoglobulina produzida inicialmente em resposta a uma infecção, a detecção de cepas pouco imunogênicas ou pouco virulentas de MS pode falhar devido à baixa resposta imune das aves. Ainda, os antígenos devem ser testados com soros sabidamente positivos e negativos antes de se proceder o teste. Má conservação ou problemas de transporte podem arruinar antígenos aprovados em testes rigorosos de qualidade, ou mesmo pequenas variações entre partidas de antígeno, como a presença de grumos inespecíficos, devem ser identificadas e compensadas na interpretação dos resultados.

A PCR comportou-se como o teste de maior sensibilidade. Em dois lotes esta técnica detectou a infecção com 5 e 16 semanas de antecedência, respectivamente, à positividade verificada em outros testes. A positividade de todos os 10 suabes colhidos em duas

oportunidades também sugere alta sensibilidade para a PCR. Nas semanas em que o isolamento de MS foi possível, o máximo de 60% dos suabes resultaram em positividade, enquanto a PCR chegou a 100% dos suabes testados. Estas informações reforçam a necessidade de se adotar a PCR como técnica de rotina na vigilância do MS em matrizes de corte.

Quanto ao número de amostras utilizado, quando testados isoladamente os 10 suabes foram satisfatórios na detecção precoce da infecção e podem ser adotados como rotina na vigilância. Em uma população de 12.000 aves, a amostra de 10 suabes irá detectar um positivo pelo menos, com 95% de confiabilidade, se a prevalência no lote for de pelo menos 30%. A detecção da infecção por PCR ocorreu, provavelmente, quando a prevalência interna atingiu ao índice de 30%. Esta prevalência é atingida, portanto, muito anteriormente à resposta sorológica franca no lote. Um número maior de suabes pode ser testado para se atingir prevalência menores e portanto detectar a infecção ainda mais precocemente. Cabe ressaltar, entretanto, que suabes traqueais carregam poeira e outras partículas que podem estar contaminadas com MS oriundo de aves infectadas, resultando em maior sensibilidade real do que aquela calculada pelos métodos estatísticos.

Com a execução deste trabalho, se concluiu que lotes livres de MS introduzidos em uma granja endêmica irão provavelmente se infectar durante a recria. A infecção apresenta um comportamento previsível nos lotes introduzidos, iniciando durante a recria e cursando de forma subclínica. Há maiores chances de se obter evidência da infecção assintomática através de PCR nas primeiras semana de vida, ou através de tentativas de isolamento de MS nas semanas do início da produção de ovos. A detecção da infecção por MS baseada apenas em testes sorológicos deve ser tomada com cautela e sugere-se a adoção da PCR como técnica rotineira de vigilância.

3. Variabilidade do MS

A variabilidade dos constituintes celulares é um tema comum entre microorganismos. Quando ocorre em componentes importantes para a virulência ou a resposta imune do hospedeiro, a variação verificada entre cepas de um organismo pode resultar em problemas práticos como a falha no diagnóstico ou a redução da proteção vacinal, se for o caso. Com micoplasmas ainda se verifica variações de clone para clone de um mesmo isolado, geralmente de pouca influência no diagnóstico mas importante por permitir evasão do sistema imune e a perpetuação da infecção no lote. Por outro lado, esta variação nem sempre acontece em constituintes celulares importantes fenotipicamente como os fatores de virulência e os antígenos de membrana. Mutações na sequência de nucleotídeos (DNA polimórfico), especialmente na região intergênica, não acarretam necessariamente alterações fenotípicas e podem ser usadas para a identificação de uma cepa especificamente do micoplasma e para a sua diferenciação das demais.

Nós adaptamos uma metodologia de amplificação de DNA polimórfico (RAPD) para comparar isolados de MS obtidos de granjas de matrizes. Esta variação do DNA não tem relação direta com a virulência ou a imunogenicidade, mas estabelece uma identidade aos isolados, o que permitiu alguns estudos de epidemiologia molecular. A infecção por MS em matrizes pesadas tem uma característica muito semelhante em granjas das diferentes regiões do país, o que levou à hipótese de que havia a ocorrência de uma cepa de MS apenas no Brasil, ou da existência de poucas cepas, porém muito semelhantes. Através do RAPD nós identificamos a ocorrência de diferentes cepas de MS, porém causando infecções com comportamento semelhante.

O RAPD permitiu diferenciar os MS isolados de uma amostra vacinal, de uma amostra de referência e daquelas obtidas de outras granjas de matrizes. Esta metodologia pode ser usada, portanto, quando há suspeitas de que uma infecção tenha sido causada pela amostra vacinal, desde que o MS seja isolado de aves afetadas. Também se pode utilizar o método de

RAPD para a identificação de cepas não vacinais em um lote vacinado, sempre, obviamente, dependendo da necessidade de se isolar o MS. Finalmente, esta técnica pode ser utilizada para a confirmação da identidade de qualquer amostra de MS, incluindo a cepa padrão quando usada em antígenos para diagnóstico.

Nenhuma diferença considerável pode ser observada quando foram comparados em RAPD os isolados obtidos de outros lotes alojados na mesma granja em anos anteriores. Isto sugere que a mesma amostra do patógeno tem permanecido como infectante na granja. Todos os isolados de MS obtidos de uma mesma granja tiveram perfil RAPD idênticos e são presumivelmente da mesma cepa. Além de manter-se indefinidamente na granja, é possível que os isolados de MS estejam exercendo exclusão competitiva e evitando a infecção das aves por outras cepas. A substituição de cepas de MS através de exclusão competitiva não está descrita na literatura disponível publicamente, porém é de conhecida importância para a substituição de amostras selvagens por amostras vacinais em granjas contaminadas por MG e possivelmente também ocorre com MS.

Os isolados de MS foram claramente classificados em diversos grupos no RAPD. Quando usados em outros testes, entretanto, esta variabilidade não foi evidente, conforme pode ser verificado detalhadamente nos capítulos a seguir. Quando frangas SPF ou matrizes pesadas foram experimentalmente infectadas com isolados de grupos com diferentes perfis de RAPD, tanto o comportamento clínico quanto a resposta imune não diferenciou consideravelmente. Pelo menos para os isolados por nós avaliados até o momento, aparentemente não há a ocorrência de variantes que mereçam dedicação especial da pesquisa por oferecerem risco de falhas no diagnóstico ou de quadros de impacto muito grande na produção das matrizes. Como organismos variáveis, entretanto, todo micoplasma requer atenção da vigilância para a possibilidade de mutações ou adaptações que resultem em maior virulência. A recuperação da virulência no campo já foi verificada em amostras de MS atenuadas em laboratório,

comprovando a ocorrência natural do fenômeno, assim como variantes pouco imunogênicas já foram identificadas.

4. Virulência do MS

A virulência é conceitualmente um indicador dos postulados de Robert Koch, pelos quais um organismo pode definitivamente ser classificado como patógeno. A associação definitiva de um microorganismo com um quadro patológico e a intensidade da resposta do hospedeiro à agressão indica indiretamente a patogenicidade. A virulência, por sua vez, muitas vezes define o volume de esforços que devem ser empregados para o controle de um patógeno especificamente.

A identificação da virulência de um patógeno pode ser feita diretamente nos quadros naturais da infecção. O seu estudo através de técnicas padronizadas, porém, garante maior repetibilidade e confiança dos resultados por evitar fatores interferentes que não podem ser controlados a campo, sobretudo a presença concomitante de outros patógenos. Técnicas laboratoriais ou infecções controladas são portanto imprescindíveis para se definir a virulência de um organismo, assim como estipular intensidades de resposta do hospedeiro que podem ser de grande valia nas tomadas de decisão para seu controle na produção avícola.

A inoculação em ovos embrionados é usada como um modelo de estudo de virulência para patógenos aviários em geral. Esta técnica tem a vantagem de usar a mesma espécie para os testes da virulência e ainda poder ser conduzida com total controle de fatores interferentes que possam eventualmente colaborar para o aparecimento de resultados falsos. Entre suas desvantagens, porém, o fato de se injetar o patógeno diretamente no embrião não permite levar em conta um fator importante na virulência de qualquer patógeno, que é a sua capacidade de invasão. Ainda, a injeção de restos de cultivo celular ou componentes celulares otimizados em sua expressão "in vitro" podem levar a conclusões enganosas. Finalmente, quando se usa ovos SPF as linhagens disponíveis são de postura e não

permitem extrapolação direta a matrizes pesadas ou frangos de corte. Quando se usa ovos oriundos de linhagens de corte convencionais, por outro lado, corre-se o risco da presença de outro patógeno de transmissão vertical mesmo que as aves sejam livres de micoplasmas. A inoculação de ovos embrionados deve, portanto, ser vista sob um prisma crítico e como componente de uma avaliação global da virulência do patógeno colaborada por outras observações.

Um experimento conduzido pela Embrapa Suínos e Aves avaliou a mortalidade embrionária causada por MS em ovos oriundos de matrizes pesadas livres de micoplasmas. Os ovos foram incubados convencionalmente em grupos de 50 até o quinto dia e inoculados com diferentes amostras de MS isoladas de plantéis dos estados de Santa Catarina e São Paulo, em doses variando entre 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colônia por ovo (UFC/ovo). Um dia após a inoculação foi procedida uma nova ovoscopia para a retirada de ovos com embriões mortos por acidente ou contaminação da inoculação e a incubação foi conduzida para se obter índices de eclosão por amostra de MS testada.

Observou-se ocorrência mínima de pintos mortos ao nascer. A ocorrência de pintos mortos ao nascer é muitas vezes utilizada como indicador indireto da contaminação por micoplasmas e deve ser portanto tomada com cautela quando se trata de MS. Ainda com relação à eclodibilidade, dois isolados brasileiros não diferiram do grupo inoculado com caldo de cultura apenas, ficando inclusive com eclosão melhor que aquela verificada com a amostra padrão MS WVU 1853. Apenas um isolado brasileiro causou mortalidade semelhante à amostra padrão, enquanto outro resultou em eclodibilidade intermediária entre aquela verificada com a amostra padrão e a injeção de caldo de cultura apenas.

Este experimento contribuiu para esclarecer a ocorrência de diferentes amostras de MS no Brasil. Em virtude do comportamento muito semelhante em diferentes estados, a noção de que as amostras de MS que ocorrem no Brasil fossem muito semelhantes sempre foi um hipótese razoável. Entretanto, embora a rotulagem da virulência através da injeção de

ovos embrionados esteja fragilizada pelo exposto acima, este experimento também colaborou para definir a possível existência de várias cepas de MS em matrizes pesadas no Brasil.

A mortalidade embrionária causada por MS não parece afetar a produção de forma considerável. Mesmo na fase aguda da infecção é esperado pouco impacto sobre a taxa de eclosão. Dois pontos, porém, necessitam ser levados em conta por quem acompanha a produção de ovos férteis. A eclodibilidade pode se afetada indiretamente através da debilidade causada por infecções secundárias nas aves infectadas por MS. Também se deve lembrar que o fato de não afetar a eclodibilidade não elimina a possibilidade da transmissão vertical do patógeno e que a presença de apenas alguns pintos nascidos portadores do MS são suficientes para a contaminação de todo o lote.

Estudos da virulência de MS foram também conduzidos em frangas SPF. Dois grupos de 8 aves (SPAFAS) foram alojados em diferentes cabines isoladoras e inoculados na segunda semana de vida com 10^{11} UFC/ave dos isolados MS 443 ou MS 541, ambos obtido de matrizes pesadas. O inóculo foi depositado na fenda palatina para inalação, como forma de se dar ao MS a chance de demonstrar sua invasibilidade. A resposta imunológica foi avaliada semanalmente por SAR e pelo HI na terceira e quarta semanas após a inoculação. Os frangos foram necropsiados na quarta semana após a inoculação quando a infecção estava confirmada através títulos de HI iguais ou superiores a 80.

A resposta sorológica foi rápida, sendo positiva em SAR já na segunda semana após a inoculação. Os resultados sorológicos foi bastante semelhante para ambos os isolados de MS, indicando que estas amostras são imunogênicas e certamente responsáveis pela positividade na sorologia observada nos lotes de matrizes isoladas a campo. Nenhum sinal ou lesão macroscópica foi porém identificado nas aves inoculadas, confirmando a característica assintomática da infecção verificada nas matrizes. A não ocorrência de patógenos secundários, em função do uso de aves SPF e de ambiente com ar filtrado, certamente contribuiu para o baixo impacto da infecção.

Exames histológicos revelaram lesões apenas nos sacos aéreos, consistindo de nódulos linfóides na submucosa da traquéia e do pulmão e metaplasia cubóide do epitélio pulmonar.

Suabes foram coletados à necropsia para isolamento de MS bem como para PCR da traquéia (Fig. 1), saco aéreo direito (Fig. 2) e articulação tibio-metatarsiana, cujas positivities também demonstraram a infecção de forma inequívoca. Ambos os isolados de MS são capazes de estabelecer infecção em frangos SPF, a qual parece primariamente respiratória e não sinovial. O reisolamento da amostra MS 443, porém, não foi obtido, indicando que esta pode ser uma cepa de difícil manuseio no laboratório e capaz de dificultar seu isolamento em procedimentos de diagnóstico. Mesmo com o isolado MS 541, o reisolamento somente foi obtido da traquéia, indicando este órgão como o de eleição para o isolamento utilizado em diagnóstico.

Foto: Laurimar Fiorentin



Fig. 1 – Colheita de suabe da traquéia.

Foto: Laurimar Fiorentin



Fig. 2 – Colheita de suabe do saco aéreo.

Também estudou-se a virulência de MS em matrizes pesadas experimentalmente

infectadas. Este experimento foi delineado para se verificar se os resultados obtidos com frangos SPF poderiam ser confirmados em matrizes. Dois grupos de 6 matrizes de corte foram inoculados com 10^7 UFC/ave com MS 443 ou MS 541, injetadas no saco aéreo direito no sétimo dia de vida, enquanto um terceiro grupo permaneceu como controle não inoculado para a certificação do estado de livre de micoplasmas das matrizes. Uma tentativa de inocular matrizes com células viáveis depositadas na fenda palatina para aspiração, como procedido com as aves SPF, não resultou em infecção. Optou-se então pela injeção nos sacos aéreos, porém com uma dose infectante menor e com a avaliação anatomo-patológica do saco aéreo torácico oposto. Testes sorológicos foram procedidos semanalmente conforme descrito acima para aves SPF. Na quarta semana após a inoculação foi procedido o HI para confirmação do diagnóstico sorológico, o qual foi repetido na quinta semana quando as aves foram então necropsiadas.

Nenhum sinal ou lesão foi também observado nas matrizes, embora a exemplo do verificado com aves SPF a resposta sorológica tenha sido considerável. Ao contrário das aves SPF, no entanto, as matrizes não apresentaram lesões histológicas. A não obtenção da infecção por inalação e a não verificação de lesões histológicas, evidenciam a maior resistência das matrizes à infecção. Intrigante, porém, é o fato de a resposta sorológica ocorrer com intensidade na ausência de lesões, para o qual não se tem explicações satisfatórias.

Se tomados em conjunto os dois experimentos relatados acima, pode-se concluir genericamente que os MS isolados possuem potencial para causar infecção em ambas galinhas SPF e matrizes. As matrizes, entretanto, demonstraram resistência à infecção por inalação e não apresentaram lesões histológicas. Em virtude das diferenças na metodologia não será possível uma comparação minuciosa entre os dois grupos, porém parece clara a capacidade dos MS isolados de infectar ambas os tipos de aves e causar resposta imunológica considerável porém sem uma doença aparente quando da ausência de patógenos secundários.

Os micoplasmas agriem o hospedeiro diretamente, porém de forma branda. As lesões mais evidentes são resultantes da resposta do hospedeiro, sobretudo através da imunidade celular, direcionada aos constituintes do micoplasma presentes no tecido. É possível que através de algum mecanismo não identificado, estes isolados de MS estimulem a resposta de anticorpos com a participação mínima da imunidade celular.

A virulência de MS, assim com de qualquer patógeno, quando obtida experimentalmente carece de avaliação minuciosa. Embora tenha se confirmado a capacidade de infecção, os experimentos não representam fielmente a ocorrência natural com todos os fatores de estresse, debilitação pela produção de ovos e infecções concorrentes. Estas observações devem, portanto, ser usadas como subsídios para avaliações de possíveis casos de infecção por MS mas não serem tomadas como definitivas. A ocorrência de micoplasmoses é via de regra em quadros respiratórios complexos nos quais o MS participa como um dos componentes apenas.

5. O papel de pássaros silvestres

Várias outras espécies aviárias são sensíveis à infecção por MS além do peru e da galinha. Entre estas se incluem a galinha-da-Angola, marrecos, ganso, pombos, codornas, perdizes, faisão, periquitos e pardais. A obscuridade existente quanto a algumas características da epidemiologia da infecção por MS, especialmente a ocorrência em granjas de excelente biossegurança, e a sensibilidade de várias espécies ao MS levam a suspeitar que alguma ave de vida livre possa estar servindo como reservatório ou pelo menos como vetor mecânico deste patógeno. Recentemente, uma epidemia por MG em pássaros silvestres nos Estados Unidos da América desencadeou uma preocupação justificável para se aumentar a vigilância e a biossegurança com respeito a pássaros que freqüentam aviários, porque exemplifica a possibilidade da troca de patógenos entre galinhas e perus criados comercialmente e as espécies silvestres.

Uma investigação foi conduzida com pássaros silvestres para se detectar MS nessas aves, quer na forma da infecção ou da contaminação apenas. Em ambientes diversos, foram capturados 100 pássaros de espécies que freqüentam aviários, especialmente canários-da-terra (*Sicalis flaveola*) (Fig. 3) e pomba-rolas (*Columbina picui*) para colheita de material e imediata liberação. Colheu-se sangue da veia braqueal e suabe da fenda palatina para testes sorológicos e tentativas de isolamento do MS, respectivamente. Nenhuma positividade pode ser verificada tanto em SAR como nas tentativas de isolar o agente em meios de cultura seletivos.



Foto: Laurimar Fiorentin

Fig. 3 – Colheita de sangue da veia braqueal.

Uma tentativa de infecção experimental com MS foi também conduzida com pomba-rolas. Galinhas SPF com 8 semanas de idade foram alojadas em um isolador sob ar filtrado e inoculadas na traquéia com uma cultura de um isolado de MS obtido de matrizes pesadas. Todas as galinhas positivaram em SAR até 4 semanas após a inoculação e com oito semanas após a inoculação foram testadas em HI para a manutenção de 5 aves com títulos indicadores inequívocos da infecção (≥ 80). Nesta data foram introduzidas no isolador 7 pomba-rolas previamente testadas e sorologicamente negativas para ambos MG e MS. Todas as aves foram mantidas conjuntamente por 16 semanas, com coletas de sangue a cada duas semanas para testes de SAR e HI. Nenhuma positividade sorológica foi detectada nas pomba-rolas, sugerindo que estas aves não são sensíveis à infecção por MS.

Os resultados destes dois experimentos não contribuem consideravelmente para a noção de que pássaros silvestres podem carrear ou serem reservatórios para MS. Entretanto, inúmeros fatores influenciam a epidemiologia de uma infecção e existe a possibilidade de que a amostragem pesquisada não tenha sido o suficiente para detectar frequências muito baixas de portadores ou infectados, ou que uma determinada espécie de pássaros importante na transmissão de MS não tenha sido testada. Ainda, na tentativa de infecção de pomba-rolas, é possível que um fator pré-disponente específico estivesse ausente ou que o isolado de MS testado não seja infectivo para estas aves enquanto outros poderiam sê-lo. Testes de maior sensibilidade como a PCR, não estavam disponíveis na ocasião da condução destes experimentos e poderiam ter indicado o estado de portador de MS com maior facilidade.

Apesar da não comprovação de infecção ou contaminação não ter sido demonstrada, os pássaros permanecem uma preocupação de biossegurança. A sobrevivência de MS fora do hospedeiro tem sido demonstrada ser de 2 a 3 dias, dependendo da superfície em que este se encontra. Mesmo que a infecção não ocorra em pássaros silvestres, a possibilidade de transmissão do MS como um vetor mecânico é grande. Pássaros entram em aviários sobretudo em busca de ração, o que os coloca em proximidade às galinhas. Em plantéis de elite, o esquema de biossegurança deve contemplar tela fina nos aviários para evitar a entrada de pássaros, bem como os silos devem ser cercados com tela ou estarem distantes do aviário. Espantalhos ou outros artifícios semelhantes tem pouca eficiência em manter pássaros distantes dos aviários e se deve dar preferência a soluções definitivas na estrutura do aviário.

O controle dos pássaros deve ser uma atitude de biossegurança de forma geral. Vários outros patógenos aviários além do MS podem ser carregados entre granjas, ou um determinado patógeno pode ser transmitido entre núcleos de uma mesma granja por pássaros em busca de ração. Este é um conceito relativamente novo na avicultura, e muitas granjas foram construídas sem a preocupação do isolamento contra pássaros tanto na tela quanto nas aberturas do telhado ou na possibilidade de que

ração seja desperdiçada ao redor da instalação. Melhorias para adaptar granjas antigas a novos conceitos de biossegurança são imprescindíveis para o sucesso da criação, sobretudo em áreas de grande concentração de aves.

6. Diagnóstico

Uma grande preocupação quanto às infecções por MS é o diagnóstico. Os sinais clínicos e lesões das micoplasmoses não são patognomônicos e requerem auxílio laboratorial, sobretudo de testes sorológicos para a detecção da resposta do hospedeiro e de testes microbiológicos para a detecção direta do agente. As técnicas de diagnóstico das micoplasmoses devem ainda ser sensíveis, ou seja, detectarem rapidamente a infecção, bem como específicas, não causando reações cruzadas com outros agentes.

Além de esclarecerem a etiologia das doenças, as técnicas de diagnóstico são utilizadas como meio de vigilância para a detecção de infecções por micoplasmas. Nestes casos, a sensibilidade de um teste de triagem como a SAR é um fator extremamente importante para a detecção precoce da infecção bem como para não ocorrerem falsos resultados negativos. Entretanto, nos últimos anos tem sido demonstrado que o teste de PCR é de maior sensibilidade e deverá ser popularizada como a técnica de eleição para vigilância do MS, embora seja de maior custo financeiro. A confirmação do diagnóstico é sempre feita por uma segunda técnica que pode ser de menor sensibilidade, mas que deve ter boa especificidade para definir o resultado com exatidão. Nestes casos o isolamento do agente tem sido o mais usado, porém aqui também a PCR deverá ser a técnica de eleição no futuro quando mais laboratórios estiverem adequados para a sua execução e seu custo for reduzido.

Vários experimentos tem sido conduzidos na Embrapa Suínos e Aves visualizando melhorias no diagnóstico de MS. As técnicas sorológicas ainda são imprescindíveis ao diagnóstico e têm recebido atenção especial. Facilidades para a elaboração e manutenção de antígenos têm sido um objeto de estudo também, e a forma ideal de aplicação dos testes tem sido identificada em diferentes experimentos

relatados em seus respectivos capítulos neste documento. Finalmente, resultados obtidos por nós apontam para a PCR como a técnica de eleição para a detecção precoce da infecção por MS.

A tecnologia para a elaboração de antígenos para SAR foi desenvolvida pela Embrapa em 1994. A criação do PNSA, a importância da SAR como método de triagem sorológica aliada à intermitente disponibilidade dos antígenos no mercado brasileiro na época, além do elevado preço dos antígenos importados, estimularam a busca por autonomia na elaboração deste insumo. Variações na técnica e o uso de diferentes cepas de MS foram testadas na elaboração do antígeno. As cepas brasileiras testadas não resultaram em vantagens sobre a cepa padrão, especialmente no referente às reações cruzadas em soros de aves recém vacinadas com bacterinas oleosas para a coriza infecciosa, mesmo que a rentabilidade na produção do antígeno tenha sido melhor com um isolado brasileiro. Em virtude de melhor especificidade, a tecnologia foi então finalizada com a amostra padrão MS WVU 1853, usada de forma genérica como uma cepa de referência para a espécie.

A tecnologia de produção do antígeno de MS para SAR foi transferida ao Laboratório Biovet S/A para a sua produção industrial. Desde 1995 a empresa vem elaborando o antígeno e disponibilizando aos mercados do Brasil, Bolívia e Costa Rica sob a marca Synovitest®. Aproximadamente 450.000 doses são produzidas anualmente e utilizadas pelo setor produtivo desde 1995, solidificando a tecnologia como um sucesso de transferência do benefício da Embrapa ao setor produtivo através da iniciativa privada.

Outras ações da Embrapa também estiveram relacionadas ao diagnóstico do MS. Os antígenos de HI são também uma preocupação em função do caráter definitivo que atualmente a técnica tem para o diagnóstico da infecção. Neste particular, determinou-se que os antígenos de HI, normalmente de baixa longevidade mesmo quando estocados a 70°C negativos, podem ser liofilizados e então estocados a temperatura de refrigerador doméstico por longos períodos. Esta prática

pode ser especialmente útil para o transporte do antígeno em um país com as dimensões do Brasil. Para o uso rotineiro o antígeno deve ser reconstituído em PBS e glicerol como de costume a então mantido a temperatura de congelamento doméstica (-20°C) por várias semanas. Além dos trabalhos referentes aos antígenos, a Embrapa também auxiliou no desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para MS e que poderão ser útil na elaboração de testes de diagnóstico específicos.

No diagnóstico de MS, a maior novidade dos últimos anos foi o surgimento da PCR. A especificidade e sensibilidade da técnica, aliada a rapidez na obtenção dos resultados fez com que ela se tornasse uma técnica imprescindível. Vários protocolos e kits estão disponíveis ao setor produtivo, porém melhor forma de colheita e manipulação das amostras nem sempre é conhecida. Neste particular, estabeleceu-se que a simplificação de envio das amostras de suabes traqueais pode ser obtida pela imersão em PBS seguida de fervura. Os suabes podem ser enviados pelo correio ou outra via de transporte sem refrigeração. Também se verificou que a extração do DNA usando-se acetato de amônia 8M, teve resultados semelhantes à extração fenólica e pode representar a vantagem de se evitar a exposição à toxidez do fenol.

7. Erradicação de micoplasmas

As transmissão vertical dos micoplasmas aliada à característica de doenças endêmicas que eles causam, fazem com que as micoplasmoses sejam doenças muitas vezes controladas pela eliminação do patógeno. A redução do impacto da infecção é viável em alguns plantéis através do uso de vacinas ou antibioticoterapia repetida. Plantéis básicos, como aves SPF, linhas puras e avós, são enquadrados pelo MAPA como de controle obrigatório e necessitam demonstrar negatividade para o patógeno além da não ocorrência de doença clínica. Mesmo nos plantéis de frangos, poedeiras e matrizes, que podem permanecer sob controle mas positivos para MS, o uso rotineiro de antibióticos e a ocorrência de

infecções secundárias faz com que a erradicação seja às vezes contemplada.

Pesquisas com erradicação de micoplasmas iniciaram na Embrapa com a aquisição da Granja Guanabara pelo MARA em 1984, que resultou na incorporação do seu plantel ao programa de melhoramento genéticos de aves da Embrapa Suínos e Aves. A constatação inequívoca de que as aves era portadoras de MS, além de MG, através do teste de HI e isolamento dos agentes, exigiu que um programa de erradicação fosse executado antes da transferência do estoque genético à granja da Embrapa em Concórdia, SC. Neste período o programa de seleção foi suspenso, dando-se prioridade à erradicação de micoplasmas e à melhoria das condições de saúde do plantel. A metodologia empregada e descrita abaixo, não permitia produtividade compatível com a seleção, especialmente devido à redução da eclodibilidade dos ovos tratados com antibióticos. A população da granja também estava reduzida a apenas 17.000 aves, facilitando o controle sobre o plantel.

A metodologia empregada se baseou no tratamento de ovos férteis obtidos de aves em idade avançada. Estas aves teriam supostamente maior imunidade desenvolvida contra os micoplasmas e poucas chances haviam de que algumas estivessem com a infecção na forma aguda e transferindo grande quantidade de MS através dos ovos, além de terem sido submetidas à seleção natural para resistência de forma genérica. A transmissão vertical de micoplasmas é menor nos quadros crônicos e nas galinhas vacinadas, ambas as situações em que a imunidade específica está alta. Além do tratamento dos ovos para inativar os micoplasmas, a criação da progênie em réplicas mantidas em diferentes granjas (Itaipava e Piraí, RJ) facilitou a eliminação de um grupo em que a erradicação não foi obtida, sem porém perder o estoque genético devido a existência de outro grupo equivalente e livre de micoplasmas em função do programa de erradicação aplicado.

A metodologia empregada para o tratamento de ovos férteis foi adaptada de várias técnicas descritas na literatura. Diversas publicações relatavam sucesso da injeção de tilosina na eliminação de micoplasmas aviários de ovos

férteis de perus, e de algumas publicações descrevendo a injeção de antibióticos em ovos de galinhas como eficientes na eliminação de micoplasmas. O tratamento da primeira partida de ovos incubados foi procedido com injeção de 0,1mL de uma solução de glicose a 5% contendo 50ppm de tartarato de tilosina e 6ppm de sulfato de gentamicina de uso veterinário. A injeção foi feita através de orifício perfurado com broca odontológica, usando-se agulha e seringas utilizadas para injetar insulina em humanos. A tilosina tem sua eficiência comprovada contra micoplasmas enquanto a gentamicina é um antibiótico de amplo espectro e foi utilizada para evitar contaminações oriunda da perfuração da casca.

A taxa de eclosão foi aproximadamente 60% quando os ovos foram injetados no albume através de orifício perfurado na ponta fina. Este índice ficou bem abaixo dos já reduzidos 74% devido à idade avançada das aves, observados em um grupo não injetado mantido como controle. Quando os ovos foram injetados através da câmara de ar a taxa de eclosão foi ainda pior, ficando em apenas 22%. Esta drástica redução da eclodibilidade dos ovos injetados foi compatível com os trabalhos em um estoque genético único, mas não seria vantajosa para uso rotineiro no controle de micoplasmas. Mesmo neste trabalho, o segundo tratamento dos ovos foi procedido por imersão em solução de antibióticos, como forma de se melhorar a eclodibilidade. (Fig. 4).

Os ovos tratados com antibióticos foram submetidos a fumigação e incubações convencionais. As aves obtidas destes ovos foram alojadas em galpões desinfetados submetidos a vazio populacional e monitoradas para micoplasmas através de SAR seguido de HI nos soros suspeitos ou positivos, efetuada em 5% do plantel às 5, 10 e 16 semanas de idade e a cada 6 semanas a partir de então. Esporadicamente foram coletados suabes de traquéia de grupos de 20 ou 30 aves para tentativas de isolamento de micoplasmas. Os testes de PCR, de grande sensibilidade para o monitoramento de micoplasmas, não estavam ainda disponíveis na ocasião. Sorologias efetuadas às 10 e 16 semanas revelaram positividade tanto para MS como para MG na réplica alojada na granja de Piraí, a qual foi

então eliminada e os trabalhos de erradicação continuados com a réplica alojada na granja de Itaipava. Inúmeros fatores ligados a biossegurança podem ter influenciado o sucesso da erradicação, ficando portanto impossível identificar os motivos exatos do sucesso ou fracasso nas diferentes réplicas. Teoricamente, um ovo apenas que não tenha recebido antibiótico pode ter sido o responsável pela manutenção dos micoplasmas na progênie, ou mesmo a pressão de infecção da granja, algo difícil de se quantificar, tenha causado a infecção dos lotes tratados e lá alojados.

A réplica negativa para micoplasmas foi criada até a produção de ovos e somente utilizada para a colheita de ovos para a repopulação da granja quando com 120 semanas de idade. Para se evitar redução da eclodibilidade nesta ocasião, os ovos não foram injetados mas sim mergulhados em uma solução de antibióticos contendo 150ppm de tartarato de tilosina, 600ppm de sulfato de gentamicina e 250ppm de amônia quaternária usada como desinfetante da casca. Os ovos foram fumigados com formol e permanganato de potássio de forma convencional, deixados a 37°C por três horas e então mergulhados na solução de antibióticos resfriada entre 2°C e 6°C em congelador doméstico por dois minutos, para que a pressão negativa criada pela diferente temperatura absorvesse o antibiótico através dos poros naturais da casca (Fig. 4).

A segunda geração obtida com a incubação de ovos tratados com antibióticos foi monitorada conforma descrito acima e criada até a maturidade. Nenhuma positividade foi detectada, mas mesmo assim os ovos férteis foram transportados para o incubatório da Embrapa em Concórdia, SC, e tratados novamente por imersão em solução de antibióticos como descrito acima. As aves obtidas desta incubação foram então introduzidas na granja de melhoramento genético da Embrapa Suínos e Aves do distrito de Tamanduá, em Concórdia, SC, a qual já continha um plantel de linhas puras negativo para ambos MG e MS.



Foto: Acervo da Embrapa

Fig. 4 – Aspecto do tratamento de ovos por imersão em solução de antibióticos como prática utilizada na erradicação de micoplasmas.

Desde 1988 as linhas puras da antiga Granja Guanabara submetidas a erradicação de micoplasmas fazem parte do plantel da Embrapa Suínos e Aves. A granja tem sido monitorada regularmente por sorologia de acordo com as exigências do PNSA e eventualmente com tentativas de isolamento e PCR, sempre se confirmando como negativa para ambos MS e MG. Com o passar de 15 anos não resta dúvida que ambos MS e MG foram erradicados. Micoplasmas são patógenos que podem permanecer endêmicos e latentes por longos períodos, mas neste caso houve tempo o suficiente para uma exacerbação de qualquer infecção possivelmente mantida de forma latente no plantel.

O plantel é mantido em uma área de grande concentração de galinhas de exploração comercial. Além disso, muitos produtores rurais mantêm pequenos plantéis para sua subsistência, conhecidos como “galinhas de fundo de quintal”. O extrato comercial de frangos e matrizes é virtualmente livre de MG, porém há uma incidência relativa de MS. Já nos plantéis de subsistência dos produtores, a ocorrência tanto de MS quanto de MG é comum. Estas observações indicam que a pressão de infecção para micoplasmas é considerável na área. A não ocorrência de contaminação do plantel ao longo dos anos, portanto, indica que a biossegurança adotada tem sido eficiente para evitar a contaminação da granja por micoplasmas. Embora esta não seja uma granja em que a entrada de aves, o fator mais importante na introdução de

micoplasmas, seja freqüente, a adoção de biosseguridade convencional como a proibição de visitação, a adoção de banhos e a separação da granja em núcleos isolados têm sido eficientes para evitar a transmissão lateral de micoplasmas na área.

Além dos custos financeiros, o programa de erradicação atrasou em duas gerações o programa de melhoramento genético das linhas puras. Este método, portanto, não seria aplicável de forma rotineira em matrizes, por exemplo, que é o extrato da produção com maior freqüência de diagnósticos de MS. A experiência com esta erradicação nos ensinou, porém, que micoplasmas podem ser erradicados de forma definitiva mesmo sendo patógenos latentes e de transmissão vertical. A adequação de métodos mais simples, mas igualmente eficiente na erradicação é portanto uma preocupação justificável da pesquisa e seria de grande utilidade ao setor produtivo para aplicação em plantéis de matrizes.

Informações importantes para auxiliar em programas de erradicação de MS foram também obtidas de uma observação prática. Durante um estudo de epidemiologia do MS em granjas de matrizes pesadas se observou que a utilização de vários tratamentos com antimicrobianos reduziram o número de aves positivas em PCR de suabes de traquéia coletados ao longo do tempo. Pesquisas detalhadas conduzidas então com o referido lote permitiram concluir que a erradicação de MS havia ocorrido de forma correlacionada com medidas de biosseguridade e tratamentos com antimicrobianos adotados.

Micoplasmas são sensíveis a antibióticos utilizados também no controle de outras bactérias. Além de serem muitas vezes usados diretamente no controle de micoplasmas, antibióticos como a oxitetraciclina (OXT) e fluorquinolonas como a enrofloxacina (ENR) e a norfloxacina (NOR), por exemplo, são freqüentemente utilizadas no controle de infecções por *Escherichia coli* (*E. coli*). Este tratamento pode ter o efeito adicional de reduzir também o impacto de uma micoplasmose.

Um lote de 12.000 matrizes obtido de avós livres de MS foi alojado em uma granja de recria endêmica para MS. As aves passaram a ser monitoradas por SAR e HI aplicados em 20 soros e tentativas de isolamento de micoplasmas e PCR em 10 suabes traqueais por colheita efetuadas às 9, 15, 23, 29, 34, 47, 54, e 59 semanas de idade. Exames adicionais foram procedidos na ocasião da eliminação do lote, às 64 semanas. A infecção por MS foi confirmada através de PCR já na primeira coleta às 9 semanas de idade.

Com 22 semanas o lote foi transferido para uma granja de produção de apenas dois aviários e que havia sido desinfetada e submetida a vazio populacional. Às 26 semanas estabeleceu-se um quadro de peritonite causado por *E. coli*, para o qual se estabeleceram vários tratamentos com OXT, ENR e NOR. A partir de 32 semanas o lote passou a receber 600ppm de OXT continuamente na ração até 59 semanas de idade.

Os soros testados em SAR foram todos positivos desde as 23 até as 59 semanas de idade, porém nunca se obteve títulos de HI positivos. Este resultado pode ter sido influenciado pelo antibiótico, evitando uma infecção grave que resultasse em produção de títulos altos de anticorpos. O estado de infectado do lote foi confirmado de forma inequívoca pela PCR, variando entre 7 e 10 suabes positivos entre os 10 testados desde 9 a 29 semanas de idade. Às 34 semanas, entretanto, apenas 1/10 suabe foi positivo e a partir de então todos os suabes testados foram negativos em PCR. Esta redução na positividade ocorreu 12 semanas após o lote ter sido transferido para granja de produção, sendo 6 semanas após o primeiro tratamento com uma fluorquinolona e duas semanas após o início do tratamento contínuo com OXT. Às 47 semanas de idade, após o lote ter recebido dois tratamentos com ENR e ter sido mantido no regime de OXT por 15 semanas, todos os 10 suabes foram negativos em PCR.

O lote foi eliminado às 64 semanas, quando 10 aves foram mantidas para a certificação do estado de negativas para MS. Estas foram submetidas a sorologia e tentativas de isolamento e PCR como descrito acima, sendo que todos os resultados foram negativos. Um grupo de 5 aves foi então submetida a vacinação com 10 doses de uma vacina de bronquite infecciosa (IBV H-120) para provocar exacerbação de um possível estado de latência do MS e alojada por mais duas semanas para acompanhamento. As aves foram necropsiadas após o desafio com o vírus da bronquite infecciosa e se confirmaram como negativas em todos os testes. Esta avaliação indica que MS foi eliminado definitivamente do lote.

A amostragem utilizada no monitoramento das aves influencia os níveis de segurança de qualquer conclusão. Neste caso, o número de 10 suabes testados em PCR permite detectar um positivo em 12.000 aves, com 95% de confiabilidade, se a prevalência no plantel for de pelo menos 30%. Com a negatividade a partir das 47 semanas, é possível apenas concluir de forma segura que a prevalência de MS esteve abaixo de 30%. Porém quando esta informação é inserida no contexto de repetições com intervalos de aproximadamente seis semanas, a negatividade em tentativas de isolamento e finalmente o desafio com o vírus da bronquite infecciosa não resultando em sinais, lesões histológicas ou positividade em PCR permite uma conclusão definitiva de que a combinação de mover as aves para um ambiente sem pressão de infecção e submetê-las a diversos tratamentos com antimicrobianos erradicou definitivamente o MS do plantel.

No Brasil, muitas granjas de matrizes pesadas são endêmicas para MS e mantidas neste estado por falta de um programa mais simples de erradicação. O vazio populacional seguido de desinfecção e repopulação com aves livres de MS é praticamente uma garantia de eliminação do patógeno, porém de pouca aplicação prática. Mesmo quando o impacto da infecção é pequeno sobre a produtividade do plantel, eventualmente as aves são submetidas a condições de estresse e imunodepressão nos quais o MS pode ter uma participação mais significativa. Além disso, a eventual necessidade de gastos com antibióticos e a redução do prestígio da empresa frente aos

compradores de pintinhos que identificam reações sorológicas nas aves adquiridas, faria com que os matrizeiros adotassem programas de erradicação desde que estes tivessem menor custo e fossem compatível com a produção. Métodos de substituição de amostras de MS nas granjas e utilização de antibioticoterapia e imunidade ativa, e combinações destes, deverão ser em breve testados como formas de auxiliar na erradicação de MS sem a necessidade de depopular as granjas.

8. Conclusões

As informações relatadas e discutidas em perspectiva neste documento demonstram a preocupação da Embrapa Suínos e Aves com as necessidades do setor produtivo quanto a esclarecimentos necessários relativos à infecção pelo MS. Informações importantes foram produzidas por este centro de pesquisa no tocante à epidemiologia das infecções por MS, seu diagnóstico e controle. Muitos treinamentos foram também concedidos nos últimos anos para a capacitação de um maior número de laboratórios e para a formação de pessoal capacitado para diagnosticar a infecção por MS. Artigos técnicos e científicos foram publicados e palestras proferidas em diversos eventos, como forma de auxiliar a formação de massa crítica preparada para a resolução dos problemas causados pelo MS.

Muitas informações ainda terão que ser obtidas, como a definição de elementos importantes na epidemiologia da infecção, a qual muitas vezes surge de forma enigmática em granjas de boa biossegurança. Formas de se eliminar a infecção de um plantel também necessitam ser pesquisadas para que a erradicação traumática que se utiliza da eliminação do plantel, seguido de repopulação com aves livres, possa ser substituída por programas que contemplem a produção enquanto a eliminação do micoplasma se procede. Por esses motivos, as pesquisas com MS devem continuar nos próximos anos na Embrapa Suínos e Aves e resultarem em informações e tecnologia importantes para definições referentes à infecção por MS.

9. Referências bibliográficas

BALEN, L.; FIORENTIN, L. Comparação entre liofilização e congelamento como métodos de conservação de antígenos hemaglutinantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.42, p.363-369, 1990.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 44, 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, p. 68-70, 24 ago. 2001. Seção 1.

FIORENTIN, L.; BALEN, L.; FIALHO, F.B. Patogenicidade de amostras de *Mycoplasma synoviae* isoladas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.405-410, 1991.

FIORENTIN, L.; JAENISCH, F.R.; Tentativa de infecção experimental da pomba-rola (*Columba picu*) com *Mycoplasma synoviae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.5, p.573-575, 1994.

FIORENTIN, L.; JAENISCH, F.R.; FIALHO, F.B. Estudo da patogenia de *Mycoplasma gallisepticum* em ovos embrionados de galinha. ("in ovo" study of *Mycoplasma gallisepticum* pathogenicity). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 25, p.74-81, 1997.

FIORENTIN, L.; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; ANTUNES, S. C.; COSTA, J.L.A. da; SONCINI, R.A.; VIEIRA, N.D. Test profiles of broiler breeder flocks housed in farms with endemic *Mycoplasma synoviae* infection. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.1, p.37-43. 2003.

FIORENTIN, L.; SILVEIRA, R.M. Eficiência de antígenos aglutinantes elaborados com diferentes amostras de micoplasmas aviários. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.123-132, 1996.

FIORENTIN, L.; SONCINI, R.A.; COSTA, J.L.A. da; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; TODA, M.; VIEIRA, N.D. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatments directed to control *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 32, n.2, p.213-216, 2003.

SILVEIRA, R.M.; FIORENTIN, L.; MARQUES, E.K. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis. **Avian Diseases**, v.40, p.218-222, 1996.

SILVEIRA, R.M.; MARQUES, E.K.; NARDI, N.B.; FIORENTIN, L. Monoclonal antibodies specie-specific to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v.37, p.888-890, 1993.

Circular Técnica, 40

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@cnpas.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2004): tiragem: 1.000

Comitê de Publicações

Presidente: Paulo Roberto Souza da Silveira
Membros: Paulo Antônio Rabenschlag de Brum,
Janice Reis Ciacci-Zanella, Gustavo J.M.M. de
Lima, Júlio Cesar P. Palhares e Cícero J. Monticelli

Revisores Técnicos

Cícero Juliano Monticelli e Jalusa Deon Kich

Expediente

Tratamento editorial: Tânia Maria Biavatti Celant
Normalização bibliográfica: Irene Z. P. Camera