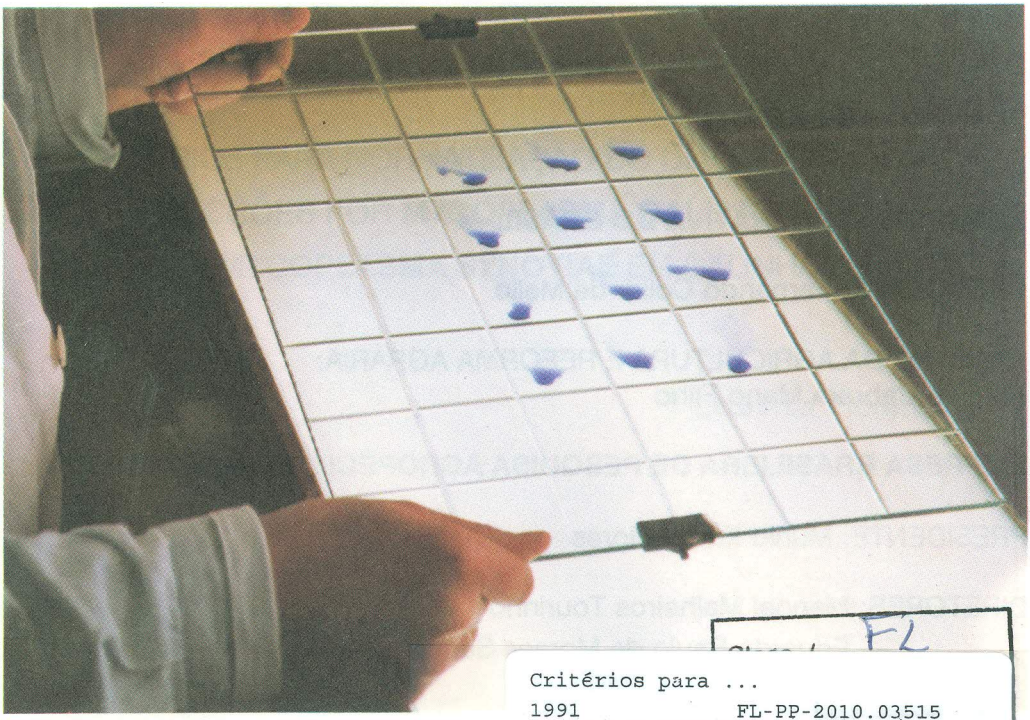
CIRCULAR TÉCNICA
Número 13

3515
1991
FL-PP-2010.03515

1991

CRITÉRIOS PARA NORMATIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR **MYCOPLASMA GALLISEPTICUM** e **MYCOPLASMA SYNOVIAE** EM GALINHAS



Critérios para ...
1991 FL-PP-2010.03515
CNPSA- 17967-1

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura e Reforma Agrária
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES – CNPSA
Concórdia, SC

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

PRESIDENTE: Fernando Collor de Mello

MINISTRO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA:
Antônio Cabrera Mano Filho

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

PRESIDENTE: Murilo Xavier Flores

DIRETORES: Manoel Malheiros Tourinho
Eduardo Paulo de Moraes Sarmento
Fuad Gattaz Sobrinho

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES - CNPSA

CHEFE: Paulo Roberto Souza da Silveira

CHEFE ADJUNTO TÉCNICO: Cláudio Bellaver

CHEFE ADJUNTO DE APOIO: Adenir José Basso

ISSN: 0102 - 3713

CIRCULAR TÉCNICA Nº 13 1991

CRITÉRIOS PARA NORMATIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR **MYCOPLASMA GALLISEPTICUM** e **MYCOPLASMA SYNOVIAE** EM GALINHAS

Laurimar Fiorentin

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura e Reforma Agrária
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES - CNPSA
Concórdia, SC

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao:

CNPSA - EMBRAPA
BR 153 - Km 110 - Vila Tamanduá

Telefones: (0499) 44-0122 e 44-0070
Telex: (492) 271 EBPA BR
Fax: (0499) 44-0681

Caixa Postal 21
89 700 - Concórdia - SC

Tiragem: 2000 exemplares
Tratamento Editorial: Tânia Maria Giacomelli Scolari

FIORETIN, L. **Critérios para normatização do diagnóstico das infecções por Mycoplasma gallisepticum e Mycoplasma synoviae e, galinhas.** Concórdia: EMBRAPA - CNPSA 1991. (EMBRAPA-CNPSA. Circular Técnica, 15p).

1. **Mycoplasma gallisepticum** - diagnóstico - normatização. 2. **Mycoplasma synoviae** - diagnóstico - normatização. I. Título. II. Série.

CDD - 636.50896925

© EMBRAPA - 1991

SUMÁRIO

1 - Introdução 05
2 - Diagnóstico em Pintos 07
3 - Diagnóstico em Galinhas 09
4 - Classificação dos Lotes 12
5 - Classificação de Núcleos 13
6 - Referências Bibliográficas 14

CRITÉRIOS PARA NORMATIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR **MYCOPLASMA GALLISEPTICUM** e **MYCOPLASMA SYNOVIAE** EM GALINHAS

Laurimar Fiorentin(1)

1 - Introdução

As infecções por **Mycoplasma gallisepticum (M. gallisepticum) e Mycoplasma synoviae (M. synoviae)** são de caráter endêmico em galinhas e transmitidas verticalmente pelo ovo. Essas duas características, aliadas às perdas econômicas, causadas por baixa produtividade e tratamento antibiótico, são suficientes para estimular a criação de galinhas livres de ambos os micoplasmas (Yoder Junior 1991a).

O objetivo fundamental do diagnóstico dessas infecções, portanto, é identificar a presença ou não da infecção por micoplasmas e não as doenças que eles podem causar. Todos os esforços devem ser dirigidos para classificação final de um lote(2) ou núcleo(3), como livre ou infectado com os patógenos e não como livre ou não de quadro mórbido.

O diagnóstico baseia-se em técnicas padrão com ótimos índices de repetibilidade em um mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes. As informações obtidas subjetivamente, como sinais clínicos, devem ser descartadas para a definição final do estado do lote, embora possam direcionar o diagnóstico.

As adaptações de técnicas a um laboratório em particular devem ser minimizadas e o princípio das técnicas jamais alterado. A prova de soroaglutinação rápida, por exemplo, deve ser conduzida rigorosamente dentro das recomendações do fabricante do antígeno, nunca alterando-se a proporção de soro e antígeno, diluíndo-se o antígeno, ou ainda, conduzido a prova com os reagentes em temperatura não próxima a 21oC. Para a prova de inibição de hemaglutinação (HI), nunca deve-se usar concentração do antígeno maior ou menor que 4 unidades hemaglutinantes, bem como a temperatura de 37oC. para a reação e o pH 7,4 do tampão fosfato (PBS) devem ser respeitados. A variabilidade exercida por material de diferentes fontes, água etc., pode ser eliminada seguindo os critérios estabelecidos, especialmente com a utilização de padrões internos positivos e negativos em cada prova.

---

(1) Méd. Vet., M. Sc., EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA), Cx. Postal 21, CEP 89700 - Concórdia - SC.

(2) Número indefinido de aves criadas em um mesmo aviário ao mesmo tempo.

(3) Vários lotes criados em área física isolada sanitariamente de outras criações, mas sem isolamento entre os lotes.

As técnicas aqui preconizadas para diagnóstico da infecções por **M. gallisepticum e M. synoviae** são de aceitação universal e baseiam-se na detecção de resposta humoral das aves ou na identificação dos microorganismos isolados. Como é da natureza desse processo, um diagnóstico positivo é sempre mais confiável que um diagnóstico negativo, porque a reatividade das provas é a própria comprovação de sua eficiência, enquanto a não reatividade deixa dúvidas, em relação a sua confiabilidade por má padronização, ou então porque a resposta sorológica do lote, após a infecção, é demorada, ou ainda pelas dificuldades em se cultivar micoplasmas artificialmente.

Todos os diagnósticos positivos devem ser repetidos(4) e contraprovados(5). Os resultados negativos somente devem ser considerados como tal se os controles internos das provas forem negativos e positivos. Finalmente, a seleção das técnicas foi baseada na sua eficiência para responder à necessidade de definir se um lote é infectado ou não, aliado à praticidade e à adequação dos laboratórios.

(4) Teste repetido com a mesma amostra e técnica.

(5) Teste repetido em novas amostras colhidas no mesmo lote ou núcleo.

2 - Diagnóstico em Pintos

Os pintos recém-nascidos refletem o estado sanitário do lote ou núcleo de que são originários e apenas para isso devem ser utilizados. A transmissão de imunoglobulinas pelo ovo ocorre em níveis detectáveis e, portanto, os pintos de até 8 dias de idade podem refletir o perfil sorológico aproximado do lote de origem dos ovos incubados (Kempf et al. 1988; Snell & Cullen 1977). Com relação aos micoplasmas, a transmissão de organismos viáveis dificilmente atinge níveis superiores a 5% dos pintos quando incuba-se ovos oriundos de um plantel com uma micoplasmose endêmica (Lin & Kleven 1982). Portanto, pintos recém-nascidos são ótimo material para diagnóstico sorológico (indireto), porém não se prestam para o diagnóstico microbiológico (direto).

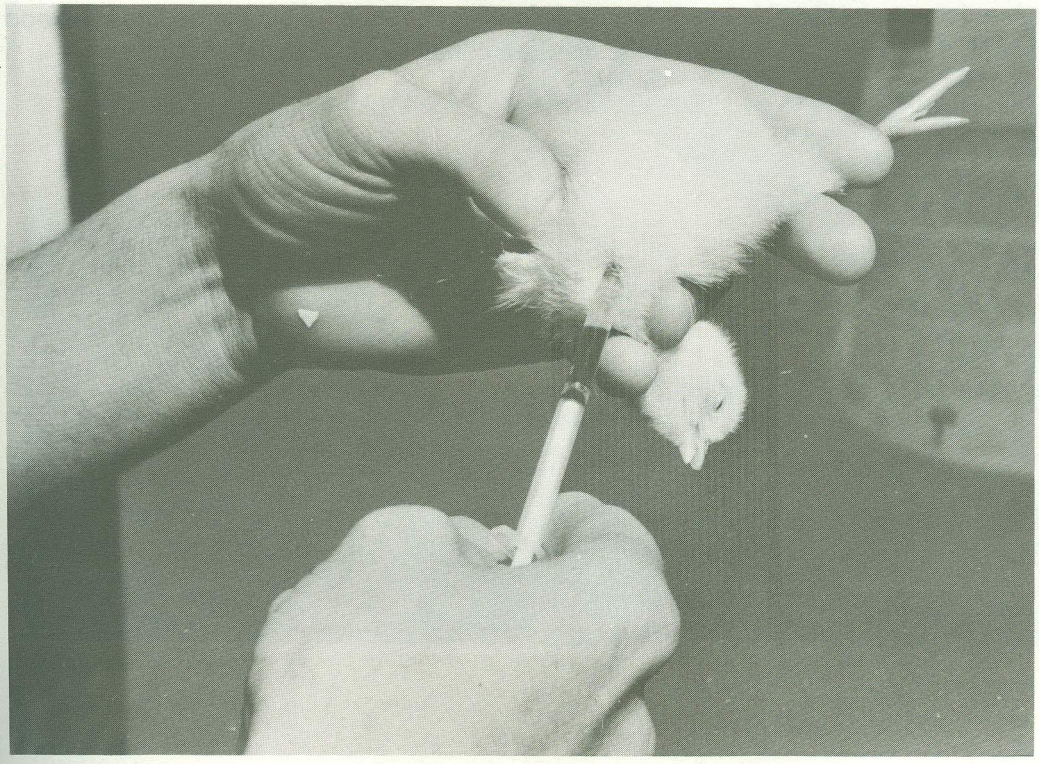
O seguinte procedimento deverá ser obedecido:

a) coletar sangue de no mínimo 30 pintos, com idade entre 3 a 5 dias, independentemente ao tamanho do lote;

b) obter soro de aparência clara;

c) submeter à prova de inibição da hemaglutinação (HI) (Williams 1980; Villegas 1986).

Laurimar Fiorentin/CNPSA



Coleta de sangue em pintos ao primeiro dia de vida.

Se na prova resultar títulos em diluições superiores ou iguais a 1:80 o teste deve ser repetido e contraprovado e, se o resultado ainda persistir o lote será considerado "originário de lote infectado".

Se a prova resultar títulos em diluição de até 1:40 deve ser repetida e contraprovada e persistindo o resultado o lote será considerado "originário de lote provavelmente infectado".

Se a prova resultar somente em títulos menores que 40 o lote será classificado como "originário de lote livre", para **M. gallisepticum** e/ou **M. synoviae**, de acordo com o antígeno utilizado.

A prova de soroaglutinação rápida (SAR) (Yoder Junior 1991b) não deve ser utilizada em pintos de até 5 dias de idade, porque apenas a imunoglobulina G é transmitida ao ovo (Johnstone & Thorpe 1988), e esta tem pouca capacidade aglutinante em comparação à imunoglobulina M (Hanson & Wigell 1985).

Um lote de pintos nunca pode ser classificado como livre de micoplasmas. Somente será considerado livre um lote com mais de 28 semanas de idade, que tenha sido submetido a pelo menos 3 testes sorológicos e uma tentativa de isolamento, com resultados negativos.

Independentemente dos resultados, os pintos devem, após a 8ª semana, seguir o esquema de diagnóstico proposto para galinhas.

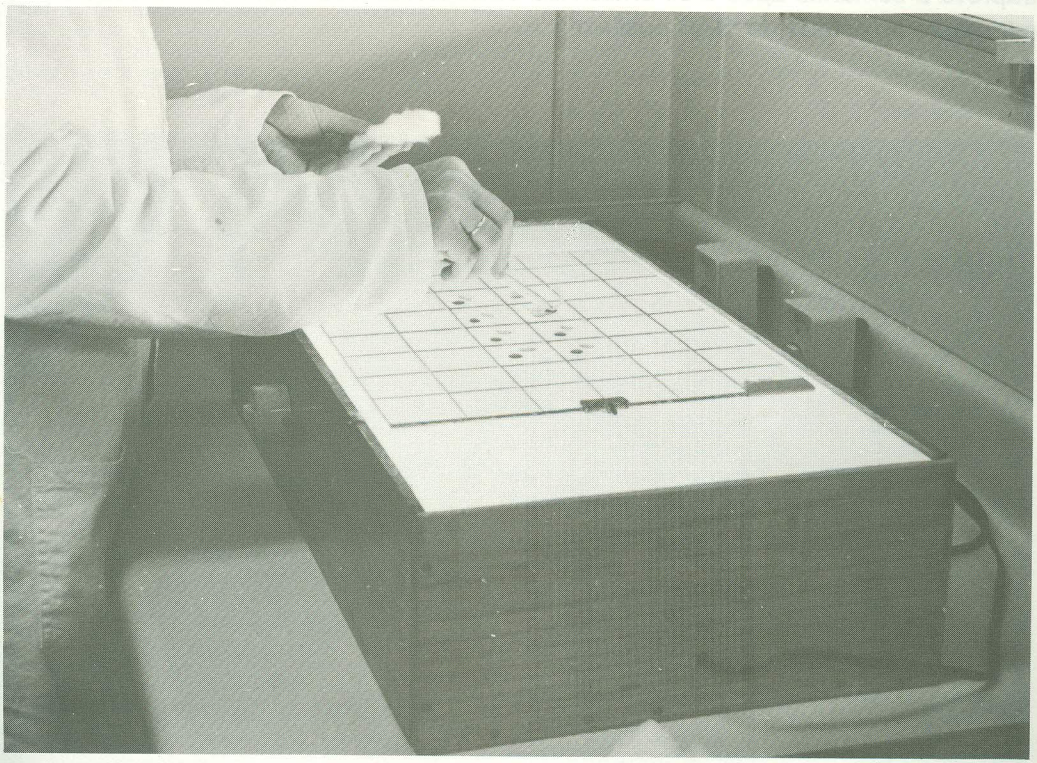
Os resultados referem-se rigorosamente ao micoplasma testado, podendo-se obter lotes "originário de lote livre", de **M. gallisepticum** e "originário de lote infectado por **M. synoviae**" simultaneamente, ou outra combinação possível.

3 - Diagnóstico em Galinhas

Em galinhas, o diagnóstico baseia-se em um teste sorológico sensível para detecção precoce da infecção, um teste específico para confirmação da resposta sorológica e um teste direto para identificação de antígenos do micoplasma procurado. De acordo com o exposto, as técnicas recomendadas são respectivamente SAR, HI e isolamento e identificação de micoplasmas por imunofluorescência (Yoder Junior 1980).

A partir da 8ª semana e em intervalos máximos de 8 semanas, uma amostra de, no mínimo, 30 soros, deve ser submetida a SAR, frente a antígeno comercial, ou elaborado no laboratório, desde que adequadamente padronizada e contendo uma amostra padrão do micoplasma.

Laurimar Fiorentin/CNPSA



Soroaglutinação rápida.

Ocorrendo mais que 5% de reações positivas, isto é, a reação resulta em grumos visíveis no prazo de 2 minutos (2 soros para uma amostra de 30), uma nova coleta deve ser efetuada, 2 semanas após, para novo teste. Repetindo-se o resultado, os soros positivos devem ser diluídos 1 para 5 em tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e retestados. O lote deve então ser classificado como "SAR positivo", ou então "SAR negativo", se os resultados iniciais já tiveram menos de 5% de reatividade.

Todos os lotes "SAR positivos" devem ser submetidos a prova de HI para confirmação, ou não, da resposta sorológica das aves. Se os resultados no HI não atingirem títulos em diluição de 1:40, o lote permanecerá apenas "SAR positivo" durante as próximas 8 semanas no máximo, podendo ser considerado "SAR negativo" novamente no próximo teste. No teste de HI, devem ser submetidos pelo menos 20 soros do lote, mesmo que poucos tenham sido positivos na soroaglutinação, porque é possível ocorrer soros com títulos altos em HI que são negativos em soroaglutinação.

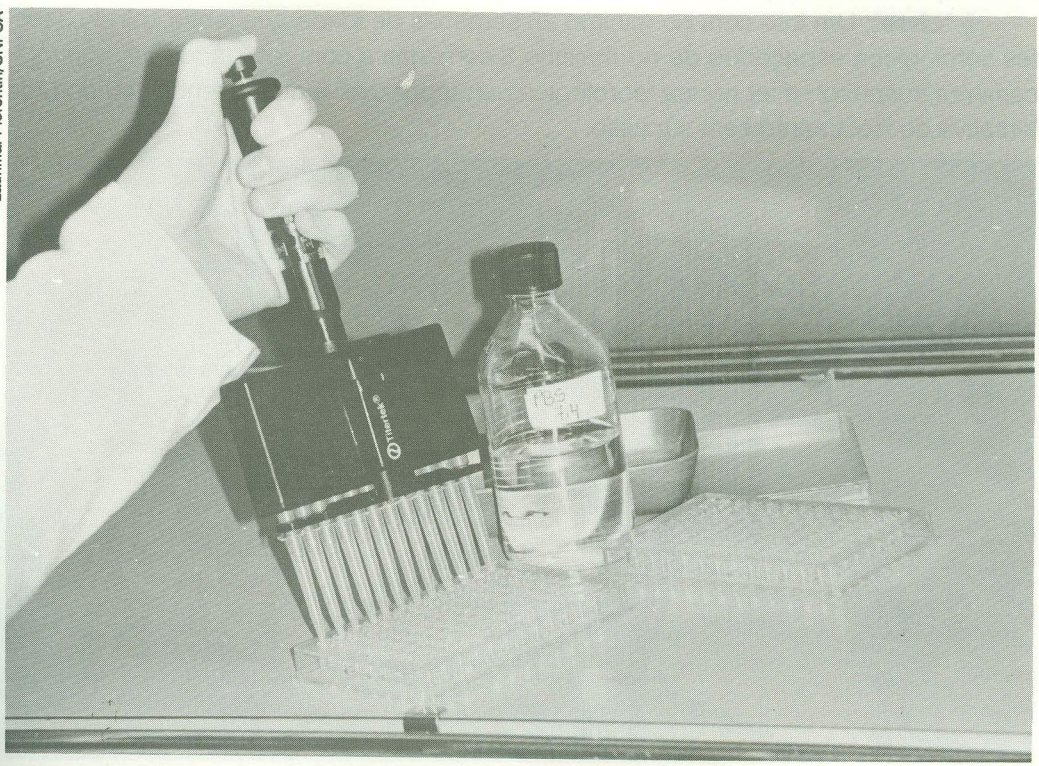
Caso os títulos observados sejam de até 40, mesmo que um soro apenas, porém em repetição, o lote será classificado como "sorologicamente suspeito".

Lotes considerados sorologicamente suspeitos devem ser submetidos a contraprova 2 semanas após e se então não se observar mais títulos de 40 ou maiores, retornarão ao estado de "SAR positivo".

Caso houver títulos iguais ou superiores em diluição de 1:80 em qualquer situação, o lote será classificado como "sorologicamente positivo", para **M. gallisepticum ou M. synoviae**, conforme o teste. Neste caso, a contraprova, 2 semanas após, apenas servirá para confirmação, sendo que o lote não mais perderá o estado de "sorologicamente positivo", mesmo que os títulos da contraprova somente alcancem diluição de 1:40.

Dos lotes "sorologicamente positivos" deve-se tentar o isolamento do micoplasma para identificação e, se lograda a identificação, o lote passará a ser considerado "infectado". Todos os lotes, mesmo "SAR negativos", devem sofrer uma tentativa de isolamento de micoplasmas, antes da 28 semana de idade. Será considerado "livre" o lote que tiver pelo menos 28 semanas de idade e tenha recebido o estado máximo de "sorologicamente suspeito", porém nunca o de "sorologicamente positivo" e tenha sofrido pelo menos 3 testagens.

Laurimar Fiorentin/CNPSA



Prova de inibição da hemaglutinação.

4 - Classificação dos Lotes

Toda a classificação deve ser acompanhada do micoplasma a que se refere.

a) **"Originário de lote provavelmente infectado"**: lote de pintos com títulos de HI igual ou superior a 40. Esse estado permanecerá até no máximo a 8a. semana, quando receberá nova classificação dada pela testagem em SAR e HI.

b) **"Originário de lote infectado"**: idem ao anterior, porém com títulos de no mínimo 80.

c) **"Originário de lote livre"**: idem aos anteriores, porém com títulos não superiores a 20.

d) **"SAR negativo"**: lote com mais de 8 semanas de idade com sorologia negativa em soroaglutinação rápida, em uma amostra de 30 soros, ou então com menos de 5% de aves reagentes.

e) **"SAR positivo"**: idem ao anterior, porém com mais de 5% de soros positivos quando diluídos a 1:5.

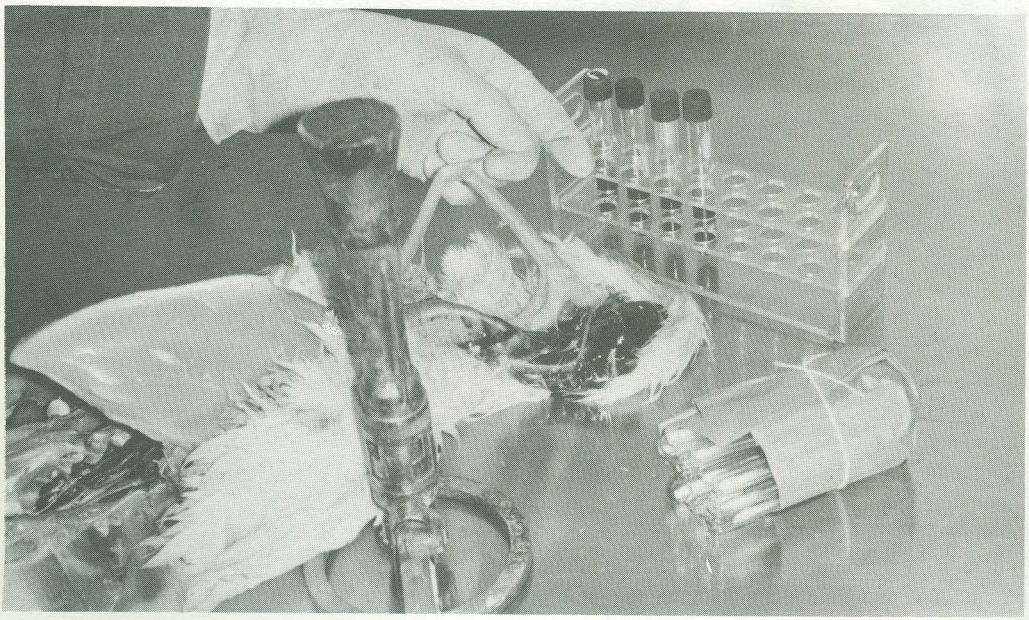
f) **"Sorologicamente suspeito"**: lote "SAR positivo" com títulos de HI em diluição de até 1:40.

g) **"Sorologicamente positivo"**: lote "SAR positivo" com tìtulos de HI em diluições iguais ou superiores a 1:80.

h) **"Infectado"**: qualquer lote acima, de que se tenha conseguido o isolamento de micoplasma, acompanhado de identificação.

i) **"Livre"**: Um lote com no mínimo 28 semanas de idade que tenha sofrido 3 testes sorológicos espaçados de no máximo 8 semanas e com resultados de "sorologicamente suspeito", mas nunca "sorologicamente positivo" e que já tenha sofrido uma tentativa de isolamento sem sucesso.

Laurimar Fiorentin/CNPSA



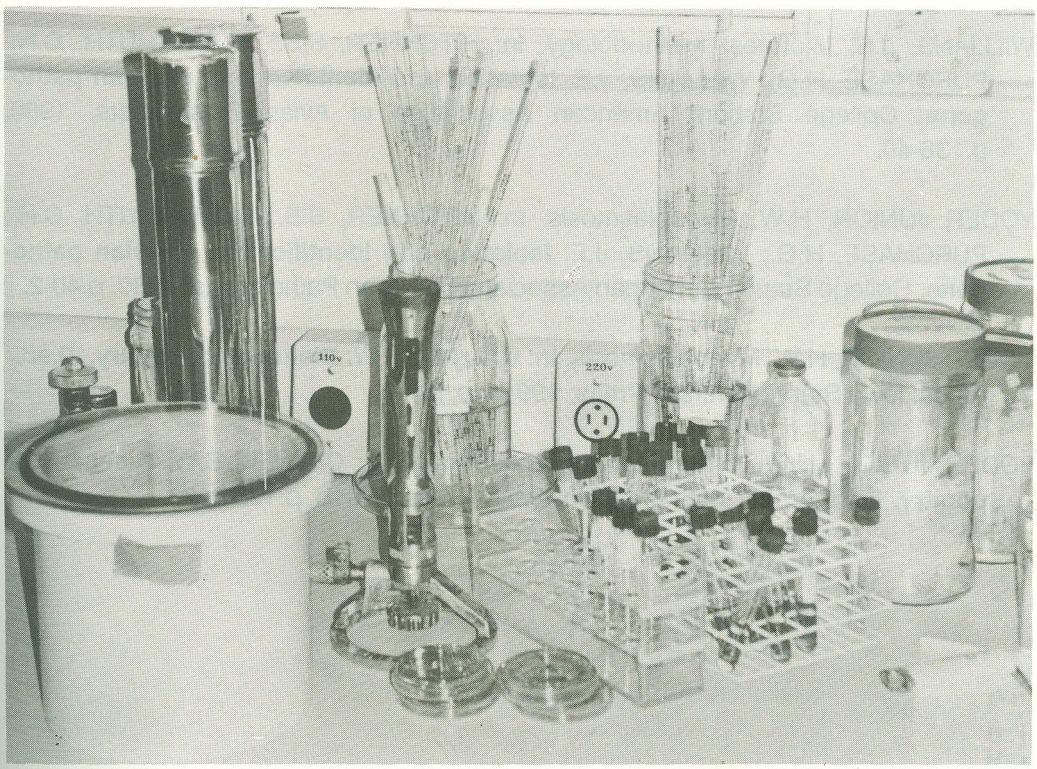
Coleta de material para isolamento de micoplasmas.

5 - Classificação de Núcleos

Os núcleos serão denominados pelo estado dos lotes quando todos tiverem a mesma classificação. Ex. "Núcleo originário de lote livre", quando for composto de lotes com todos os títulos menores que 1:40 em HI aos 3-5 dias de vida. "Núcleo SAR negativo", quando todos os lotes forem "SAR negativo", após a 8ª semana de idade.

Quando os lotes diferirem em seu estado, o núcleo será denominado pelo lote com classificação mais aproximada ao diagnóstico positivo. Ex. "Núcleo SAR positivo", quando pelo menos um lote for "SAR positivo" e "Núcleo Infectado", quando pelo menos um lote permitiu o isolamento e identificação do micoplasma em questão.

Laurimar Fiorentin/CNPSA



Cultivo de micoplasmas para isolamento.

6 - Referências Bibliográficas

HANSON, L.A.; WIGZELL, H. **Immunology.** Butterwords: London, 1985. 291p.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. **Immunochemistry in pratice.** 2 ed. London: Blacwell, 1988. 306p.

KEMPF, I.; OLLIVIER, C.L.; DROUIN, P.; GUITTET, M.; BENNEJEAN, G. Détection des anticorps mycoplasmiques dans le vitellus d'oeufs non incubés. **Revue de Medicine Veterinaire**, v.139, n.9, p.837-841, 1988.

LIN, M.Y.; KLEVEN, S.H. Egg transmission of two strains of **Mycoplasma gallisepticum** in chickens. **Avian Diseases**, v.26, n.3, p.487-495, 1982.

SNELL, G.C.; CULLEN, G.A. The detection of maternal antibodies to **Mycoplasma gallisepticum** in chicks by the rapid serum agglutination inhibition test. **Avian Pathology**, v.6, p.181-185, 1977.

VILLEGAS, P. **Laboratory manual of avian virus diseases.** Athens: University of Georgia, 1986. 62p.

WILLIANS, J.E. Microtest methodology. In: HITCHNER, S.B.; DOMERMUTH, C.H.; PURCHASE, H.G.; WILLIANS, J.E. **Isolation and identifications of avian pathogens**. College Station: American Association of Avian Pathologists, 1980. p.136-40.

YODER JUNIOR, H.W. Mycoplasmosis. In: HITCHNER, S.B.; DOMERMUTH, C.H.; PURCHASE, H.G.; WILLIANS, J.E. **Isolation and identification of avian pathogens**. College Station, American Association of Avian Pathologists, 1980. p.40-2.

YODER JUNIOR, H.W. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry.**, 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991a. p.197-8.

YODER JUNIOR, H.W. **Mycoplasma gallisepticum.** In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry.** 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991b. p.198-212.