

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

MÁBIA FERNANDES BENTO SILVA

**PREVALÊNCIA DE MICOPLASMOSE EM GALINHAS CAIPIRAS E A
PROXIMIDADE COM A AVICULTURA INDUSTRIAL**

Uberlândia

2019

MÁBIA FERNANDES BENTO SILVA

**PREVALÊNCIA DE MICOPLASMOSE EM GALINHAS CAIPIRAS E A
PROXIMIDADE COM A AVICULTURA INDUSTRIAL**

Projeto de pesquisa apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

Orientador: Prof. Dra. Belchiolina Beatriz
Fonseca

Uberlândia

2019

MÁBIA FERNANDES BENTO SILVA

**PREVALÊNCIA DE MICOPLASMOSE EM GALINHAS CAIPIRAS E A
PROXIMIDADE COM A AVICULTURA INDUSTRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
para obtenção do título de graduação em
Medicina Veterinária na Universidade
Federal de Uberlândia pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, 17 de junho de 2019.

Prof. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi

Prof. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi

Dedicatória

À Deus

“Porque vosso Pai sabe o que vos é necessário antes de vós lho pedirdes”

Mateus 6:8

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me protegeu; à Quem nunca me abandonou, à Quem me segurou em Seu colo quando não me senti capaz de caminhar sozinha, à Quem me ensina todos os dias que a vida é mais do que eu espero e me surpreende em cada momento com Seu imenso amor. Obrigada por cuidar de mim.

À minha amada família minha mãe Nilva, meu pai Juscelino, minha irmã Michelle e minha filha Antonela, vocês são a razão de toda minha luta, obrigado por cuidarem de mim, me incentivarem e por sempre estarem ao meu lado. Vocês são a minha força e motivação.

À minha querida orientadora Bia, que sempre acreditou em mim, por todas as oportunidades à mim concedidas, e principalmente pelo apoio e confiança; que foram suficientes para despertar em mim o que estava adormecido. Tenho por você, grande respeito e um carinho imenso, agradeço todo o seu incentivo, cuidado e paciência.

Agradeço aos meus amigos que estão ao meu lado desde antes da faculdade e aos que fizeram amizade no primeiro ano de faculdade e que desde então essa amizade só tem fortalecido.

Agradeço também a todos da UFU quem de uma forma indireta também estiveram envolvidos durante meu curso de graduação.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito Obrigado.

RESUMO

As micoplasmoses aviárias são doenças importantes na criação avícola industrial, pois são causas de grandes perdas econômicas. Entretanto, pouco se sabe sobre a prevalência dessas doenças na criação de galinhas caipiras. Galinhas caipiras normalmente são criadas com baixo *status* sanitário e representam um potencial risco para a criação industrial, já que aves de subsistência normalmente têm baixo nível de biossegurança. Este projeto objetivou avaliar a soroprevalência das micoplasmoses aviárias que acometem as aves caipiras da região de Uberlândia-MG. Além disso, realizar a correlação entre a soroprevalência e a sintomatologia clínica, avaliar a correlação entre o teste de ELISA e HI e por fim relacionar a proximidade dos locais soropositivos e a indústria avícola. Foram avaliados pelo método de ELISA, 200 soros de aves caipiras localizadas em diferentes propriedades da cidade de Uberlândia para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Oito propriedades foram avaliadas também pelo método de HI e avaliação da sintomatologia clínica sugestiva para as doenças. Os resultados indicaram a presença de altos títulos sorológicos para MG e MS, havendo correlação entre a sintomatologia clínica e MG. Ainda foi mostrado que há baixa concordância entre os testes de ELISA e HI, sendo que o ELISA apresentou baixa especificidade e resultados falsos positivos. Este trabalho mostrou que o MG causa prejuízos em aves caipiras, podendo ser essas, potencial fator de risco para indústria avícola local. Mostrou também que o teste de HI não deve ser substituído pelo ELISA.

Palavras-chave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, galinhas caipiras, ELISA, HI.

ABSTRACT

The avian mycoplasmoses are important diseases in the industrial poultry breeding, because they are causes of great economic losses. However, little is known about the prevalence of these diseases in the raising of hens. Backyard poultry are usually raised with low sanitary status and pose a potential risk to industrial breeding since subsistence poultry usually has low biosafety level. This project aimed to evaluate the seroprevalence of avian mycoplasmosis that affect the birds of the region of Uberlândia-MG. In addition, to correlate seroprevalence and clinical symptoms, to evaluate the correlation between the ELISA and HI test, and to relate the proximity of seropositive sites and the poultry industry. 200 sera of backyard poultry located in different properties of the city of Uberlândia were evaluated by ELISA method for *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. Eight properties were also assessed by the HI method and evaluation of suggestive clinical symptomatology for diseases. The results indicated the presence of high serological titers for MG and MS, correlating with the clinical and MG symptomatology. It has also been shown that there is low agreement between the ELISA and HI tests, and the ELISA showed low specificity and false positive results. This work showed that MG causes losses in backyard poultry which may be a potential risk factor for the local poultry industry. It also showed that the HI test should not be replaced by ELISA.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, backyard poultry, ELISA, HI.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Média dos títulos sorológicos pela avaliação do ELISA das propriedades avaliadas para MS e MG	18
Figura 2. Distribuição dos títulos em categorias para MS.....	19
Figura 3. Distribuição dos títulos em categorias para MG	19
Figura 4. Níveis sorológicos para o teste de HI das propriedades avaliadas.....	20
Figura 5. Mapeamento da localização das propriedades avaliadas e estabelecimentos de granjas comerciais.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de diagnóstico para Elisa para MG nas propriedades avaliadas	20
Tabela 2. Correlação entre sintomas respiratórios e títulos sorológicos	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCR	Doença Crônica Respiratória
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FAMEV	Faculdade de Medicina Veterinária
HI	Inibição da hemaglutinação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
SAR	Aglutinação rápida em placa
SAL	Aglutinação lenta em soro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Características Gerais	11
3.2 Etiologia	11
3.3 Sinais Clínicos e Lesões	12
3.1.4 Diagnóstico	13
3.1.5 Tratamento e Profilaxia.....	14
4 METODOLOGIA	15
4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
5 RESULTADOS	17
5.1 Resultados ELISA para MG e MS	17
5.2 Resultados de HI para MG	20
5.3 Correlação entre os títulos sorológicos das doenças avaliadas e sinais respiratórios.....	21
7 CONCLUSÃO	24
8 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

Dentre as bactérias que causam infecções de grande preocupação na indústria avícola, pode-se destacar o *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) e o controle destes agentes fazem parte do programa nacional de sanidade avícola (PNSA) (BRASIL, 2001). A legislação determina que aves ou ovos férteis de linhas puras, bisavós e avós importadas ou nascidas no Brasil que são positivas para MG e MS devem ser sacrificadas. No caso de matrizes positivas para MG também deve haver sacrifício/abate do núcleo, acompanhado de destruição de todos os ovos incubados ou não. E quando constatado positividade para MS, os núcleos poderão ser tratados com antibiótico e retestados após o período de eliminação de resíduos de antibióticos (BRASIL, 2001).

Lotes de frango de corte e poedeira comercial são classificados como de controle eventual pela legislação. No entanto, a importância do MG, como agente etiológico de doenças em frangos de corte, desperta a preocupação de técnicos e produtores, assim como de diversas empresas ligadas à cadeia produtiva da avicultura nacional e internacional. No Brasil, houve relatos do aumento das condenações de aves em abatedouros pela presença de aerossaculite, que em sua maioria decorrente de infecção pelo MG (MINHARRO et al. 2001;BRANCO, 2004). Em criações de galinhas poedeiras pode haver redução na produção de ovos quando ocorre uma forma mais crônica da doença (OIE, 2018).

O MS causa infecção subclínica do trato respiratório superior, caracterizada pela ausência de sinais clínicos ou apenas doença respiratória (STIPKOVITS & KEMPF, 1996). MS também pode causar aerossaculite em frangos (ROSALES, 1991) e é frequentemente encontrado em sua forma assintomática em granjas avícolas no Brasil (FIORENTIN et al. 2003).

Apesar da obrigatoriedade do controle de MG e MS em lotes de criação industrial esse controle em criação caipira ou de fundo de quintal é praticamente inexistente e muito pouco se sabe sobre a importância dessas bactérias em lotes caipiras.

Sendo a exploração caipira uma realidade na cultura de muitas regiões brasileiras em especial do Triângulo Mineiro é essencial o conhecimento da circulação de MG e MS nesse tipo de criação, além do prejuízo que essa bactéria gera nessa atividade avícola. Paralelo à produção caipira, a região do Triangulo Mineiro é um pólo de produção industrial e a presença de MG e MS em lotes caipiras pode representar um risco potencial para produção industrial o que reforça a necessidade do conhecimento da epidemiologia dessas bactérias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo avaliar a soroprevalência de MG e MS nas criações de galinhas caipiras da região de Uberlândia e associar a sintomatologia clínica.

2.1 Objetivos específicos

- Mapeamento epidemiológico da região de Uberlândia-MG;
- Verificar a proximidade dos locais soropositivos e a indústria avícola;
- Avaliação do risco que os planteis industriais estão submetidos;
- Avaliar a associação de soropositivos no teste de ELISA e no teste HI;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características Gerais

Um dos grandes problemas enfrentados pela avicultura mundial são as micoplasmoses aviárias causadas por bactérias do gênero *Mycoplasma* (RAZIN et al., 1998). O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e o *M. synoviae* (MS) são desencadeadores de vários prejuízos econômicos pois levam à redução na eficiência alimentar, aumento da mortalidade e aumento da condenação de carcaças nas aves de corte; queda na postura e na qualidade dos ovos, má eclodibilidade, e pode levar a quadros de doenças respiratórias, além disso, ainda há o alto custo com medicamentos e programas de controle (NASCIMENTO et al., 2005).

3.2 Etiologia

Os micoplasmas são seres procariontes os quais não apresentam parede celular, possuindo uma membrana trilaminar composta de proteínas, glicolipídeos e fosfolipídeos, os quais constituem os determinantes antigênicos; possuem formato cocóide, cocobacilar ou

pleomórficos, medem 200-300 nm. São gram-negativos e em condições laboratoriais são aeróbios facultativos apresentando colônias com menos de 1 mm de diâmetro e em forma característica de “ovo frito”. São organismos de crescimento lento que normalmente requerem 3 à 15 dias para a formação de colônia. Exigem em condições de cultivo, meio rico em proteínas, lipídios e soro animal (YAMAMOTO, 1990; RAZIN et al., 1998). Os micoplasmas sobrevivem por curtos períodos no meio ambiente e são suscetíveis à dessecação, ao aquecimento, a detergentes e a desinfetantes (QUINN et al., 2005).

A principal fonte de infecção são as aves doentes ou portadoras e o trato respiratório e é a porta de entrada primária (NASCIMENTO et al., 2005). A via de transmissão mais importante é a vertical e é geralmente aceito que o mecanismo dessa transmissão seja pelo contato direto do saco aéreo abdominal com o ovário (MORAES, 2000). A transmissão horizontal pode ocorrer por aerossóis, secreções, por contato direto com outras aves ou contato indireto com seres humanos, animais, ração, água, fômites ou introdução de aves infectadas (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

3.3 Sinais Clínicos e Lesões

MG é a espécie que causa maior impacto econômico em função das perdas decorrentes da doença crônica respiratória (DCR). As principais formas de manifestação clínica em galinhas poedeiras, frangos de corte, perus, codornas e outras aves domésticas são aerossaculite e sinusite (METTIFOGO & BUIM, 2009). A mortalidade em frangos de corte causada por MG pode chegar a 30% em aves jovens susceptíveis, causadas por cepas virulentas ou se o ambiente favorecer a exacerbação dos sinais (METTIFOGO & BUIM, 2009). Amostras patogênicas têm capacidade de adesão e invasão celular, podendo se disseminar para outros órgãos e tecidos levando a uma doença sistêmica (LEY, 2008).

Os sinais clínicos de MG em aves são tosse, corrimento nasal e ocular, diminuição no consumo de alimentos, retardo no crescimento, lotes desuniformes, queda na produção de ovos e mortalidade (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). A associação de outros patógenos, como *Escherichia coli*, com infecção por micoplasma é muito comum (KLEVEN, 1998). As aves saudáveis são pouco susceptíveis a infecções por *E. coli* quando em exposições naturais. As infecções por *E. coli*, em aves, se apresentam de forma sistêmica, principalmente quando existe imunossupressão como consequência de infecções bacterianas, como é o caso da micoplasmose (BARNES et al. 2008). A infecção por *Mycoplasma* spp. torna a ave

susceptível à bactéria *E. coli*, sendo que esses patógenos podem levar a quadros de aerossaculite grave (LEY, 2008).

MS é o principal patógeno causador da sinovite infecciosa, que é caracterizada como doença crônica das galinhas e perus que em via sistêmica, atinge as membranas sinoviais e tendinosas provocando sinovite exsudativa, tenovaginite ou bursite. A apresentação clínica mais frequente de MS é a infecção subclínica do trato respiratório superior. Porém, pode agravar e afetar os sacos aéreos e, quando associado com doença ou vacinação contra Newcastle, bronquite infecciosas ou ambas e dependendo da virulência das cepas, pode ocorrer a forma sistêmica e alcançar as articulações e provocar a sinovite infecciosa. Os sinais clínicos da sinovite em galinhas são os transtornos locomotores de claudicação, em virtude de inflamação das membranas sinoviais das articulações, visto que as principais articulações afetadas são as plantares e tibiotarsianas, mas, em muitos casos, todas as articulações podem ser afetadas (CERDÁ, 2009).

3.1.4 Diagnóstico

De acordo com a Normativa nº 44 do PNSA (BRASIL, 2001) as provas laboratoriais utilizadas no monitoramento e no diagnóstico laboratorial para as micoplasmoses aviárias são: aglutinação rápida em placa (SAR), com soro ou gema de ovos embrionados, aglutinação lenta em soro (SAL) ou gema de ovos embrionados, inibição da hemaglutinação (HI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ELISA).

A SAR é o teste de triagem mais utilizado como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses. Se o soro apresentar reação à diluição igual ou superior a 1:10, o resultado é considerado positivo, e é confirmado utilizando-se o teste ELISA ou teste de HI (BRASIL, 2001; OIE, 2018). A certificação de núcleos ou estabelecimentos avícolas livres de MG e MS, é conferida pelo MAPA para lotes de reprodutoras com resultados negativos em 300 amostras de soros testadas em SAR para MG e 100 amostras para MS às 12 semanas de vida, 150 amostras testadas para MG e 100 para MS quando o lote atingir 5% de produção de ovos. Quando positivos no HI ou ELISA, deve-se colher suabes de traquéia de vinte aves para confirmação por cultivo e/ou PCR, consecutivamente a cada três meses, sempre efetuados em laboratório credenciado pelo MAPA. Para os estabelecimentos de controle permanente e eventual, deve-se realizar SAR em 150 amostras por núcleo para MG e 100 amostras para MS, que quando positivos são

testadas por ELISA ou HI. Quando positivos no HI ou ELISA, deve-se colher suabes de traquéia de vinte aves para confirmação por cultivo e/ou PCR, consecutivamente a cada três meses, até eliminação do lote (BRASIL, 2001).

Segundo a Normativa nº 44 do PNSA (BRASIL, 2001) apenas o diagnóstico micoplasmológico é considerado conclusivo para a detecção da presença do MG e MS. Sendo considerado diagnóstico micoplasmológico, isolamento em meios de cultura e PCR.

Segundo Kleven et al. (1996), citado por OIE. (2000), o teste de escolha para a sorologia confirmatória é inibição da hemaglutinação (HI). Os títulos diagnósticos significativos no teste de HI podem não ser detectado até três ou mais semanas após a infecção. Contudo esse teste é altamente específico, mesmo para o nível de diferenciação entre cepas. Porém, atualmente tanto o ELISA quanto o HI podem ser usados como teste de sorologia confirmatória.

Yilmaz et al. (2011) compararam HI, PCR e cultura bacteriana como método de diagnóstico de micoplasmose em frangos de corte e encontraram concordância de 96,3% para MG e 95,7% para MS entre essas três técnicas.

3.1.5 Tratamento e Profilaxia

Os micoplasmas são sensíveis à vários antibióticos, como estreptomicina, oxitetraciclina, clortetraciclina, eritromicina, tilosina, lincomicina, espectinomicina, danofloxacina e tetraciclina. Os antibióticos podem aliviar os sinais clínicos e lesões, mas o tratamento não elimina o agente. O controle das infecções secundárias com antibióticos também diminui os prejuízos (MORAES, 2000). Embora medicamentos antimicrobianos sejam usados durante surtos, o estabelecimento de lotes livres dos patógenos é o método mais eficaz para controle da doença (QUINN et al., 2005).

Medicação das aves com antimicrobianos e vacinação tem sido usada como esquema de controle das infecções por micoplasma. Porém a vacina é viva e só é permitida para lotes de controle eventual sendo proibidas para reprodutoras (BRASIL, 2001). O tratamento de aves reprodutoras com antimicrobianos, apesar de diminuir o índice de manifestação clínica, e conseqüentemente, a taxa de transmissão transovariana, não erradica os micoplasmas do plantel (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

Segundo Brasil (2001) ovos férteis de linhas puras, bisavós e avós importadas ou nascidas no Brasil, quando positivas para MG e MS, devem ser sacrificadas. Para matrizes constatando-se positividade para MG, deve haver sacrifício/abate do núcleo e destruição de todos os ovos incubados ou não, dele provenientes. Constatando-se positividade para MS em matrizes, esses núcleos poderão ser tratados com antibiótico e retestados após o período de eliminação de resíduos de antibióticos, o que vai depender do tempo de eliminação de cada antibiótico. Lotes de matrizes que tiveram positividade para MS são considerados controlados. Os estabelecimentos considerados sob vigilância e controlados deverão adotar um reforço nas medidas de biossegurança (BRASIL, 2001).

A vacina viva é recomendada para galinhas poedeiras comerciais para reduzir as perdas produtivas e prevenir a transmissão da infecção (NASCIMENTO, 2000)

4 METODOLOGIA

O trabalho foi submetido ao comitê de Ética em Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob o número 036/18. Foi realizado um cadastro de propriedades que tenham entre 30 a 900 aves, tanto da área urbana como rural. O número de propriedades cadastradas foi de 34 com um total de 2.836 aves. Desse total foram coletadas 200 amostras de sangue de galinhas com idade entre 12 e 56 semanas em 19 propriedades rurais que exercem a prática de criação de aves caipiras na região de Uberlândia-MG, de março a outubro de 2018. As amostras de sangue foram obtidas pela punção do sangue pela veia ulnar, com agulhas e seringas estéreis e descartáveis, e estocadas em tubos para coleta à vácuo com ativador de coágulo (sílica), devidamente identificados, totalizando 8-10% das aves de cada propriedade. Estas amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas até a chegada ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi realizado a pipetagem do soro sanguíneo com o

auxílio de pipetas automáticas e ponteiras individuais e em seguida, encaminhado para o Laboratório de Saúde Animal da Indústria, para análise sorológica pela metodologia ELISA indireto para detectar anticorpos contra MG e MS, utilizando *kit* comercial (Idexx) conforme instruções do fabricante.

Primeiramente, antes de efetuar a análise, as amostras foram diluídas em proporção 1:500. Então as placas de ELISA foram sensibilizadas com antígeno pelo fabricante, correspondente ao anticorpo alvo e registrada a posição de cada amostra. Posteriormente foi adicionado 100uL de cada amostra já diluída em cada poço e incubada à 18-26°C por 30 minutos. Após este período, foi realizada lavagens em cada cavidade, de 3-5 vezes usando aproximadamente 350uL de água destilada. Ao fim da lavagem foi adicionado 100uL de conjugado enzimático em cada cavidade e incubado novamente à 18-26°C por 30 minutos. A lavagem das cavidades foi repetida como anteriormente. Após, foi adicionado 100uL de solução de substrato TMB em cada cavidade e incubado novamente, por 15 minutos à 18-26°C. Para finalizar, foi adicionado em cada poço 100uL de Solução de Interrupção afim de parar a reação. Os valores foram medidos por espectrofotômetro por densidade ótica e pelos valores de absorbância a 650 nm e registrados. Os cálculos dos títulos foram automaticamente liberados pelo *software*, o qual lançou os resultados (IDEXX, 2012).

Para avaliar a possibilidade de substituição do ELISA pelo HI foi realizada análise da associação entre o teste de HI e o teste de ELISA para MG. Em 08 propriedades (11,12,13,14, 15, 17, 18 e 19) os soros das aves foram testados pela reação da inibição da hemaglutinação.

O teste de HI foi realizado utilizando microplacas de 96 cavidades, com fundo em “U”. Como fonte de antígeno foi utilizado 4 UHA (Unidades Hemaglutinantes). Os soros foram submetidos a diluições seriadas, em PBS pH 7,2, de razão 2, de 1:2 até 1:4096, num volume de 50 uL por cavidade da micoplaca. Então, foi adicionado 50 uL de antígeno em contato com as diferentes diluições dos soros e incubados à temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. A seguir, foram adicionadas 50 uL da suspensão de papa eritrócito de pintinhos, previamente padronizada com solução tampão PBS pH 7,2, a 1,0% (0,5ml de hemácias + 50ml de PBS) e padronizada em espectrofotômetro (545nm), com densidade óptica desejada, por volta de 0,33-0,35. A leitura da reação foi realizada após o período de incubação de 30min à temperatura ambiente.

Afim de correlacionar sintomas respiratórios e títulos sorológicos foi realizada uma inspeção visual de sintomas clínicos no momento da visita, além de perguntas aos

proprietários sobre sintomas recorrentes. Por fim, utilizando o georreferenciamento do Google Maps foi realizado o mapeamento das propriedades para o conhecimento da proximidade com granjas industriais.

4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

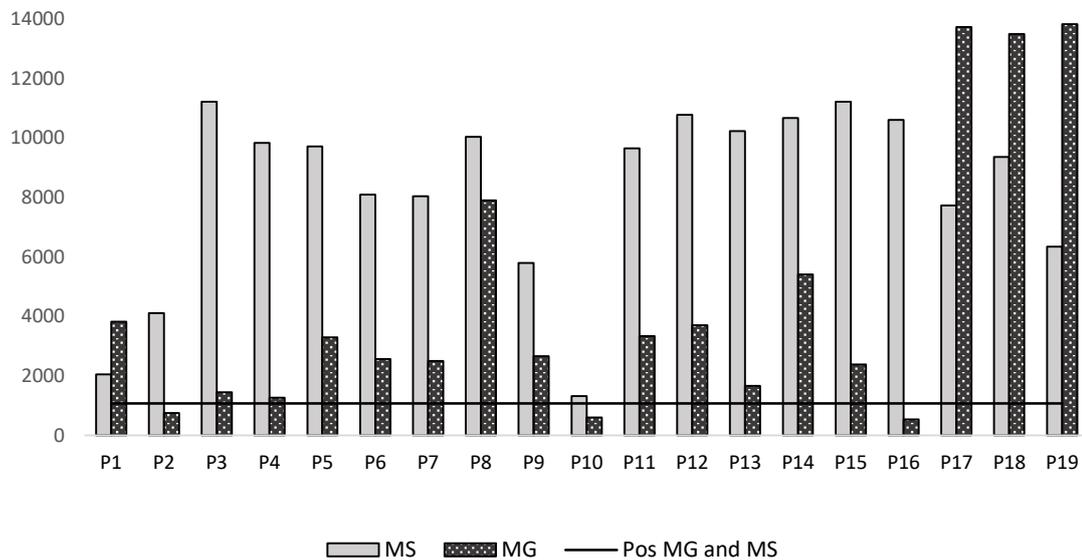
Para análise estatística foi realizada estatística descritiva usando média e desvio padrão. Para avaliação da correlação foi usado o teste de Spearman ($p < 0,05$). Para os testes de diagnóstico foi usado o qui-quadrado seguido dos testes de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Foi considerado um nível de significância de 0,05 e utilizado o programa Graphpadprism 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados ELISA para MG e MS

Das propriedades visitadas, apenas 4 (quatro) já haviam adotado a vacinação, sendo a P5 (Bouba, Bronquite, New Castle e Gumboro) P9 (Bouba e New Castle), P17 (New Castle, Bouba, Marek, Coriza, Bronquite, Gumboro) e a P19 (New Castle, Bouba, Marek, Coriza e Bronquite). Não foi informado quais nomes comerciais ou laboratório das vacinas utilizadas. Não foi possível afirmar se as aves avaliadas haviam sido vacinadas para as doenças acima mencionadas, o que se sabe é que houve vacinação nessas propriedades para as doenças citadas aproximadamente 6 à 12 meses anteriores à coleta. Contudo é importante o conhecimento desses dados, já que este trabalho realizou a avaliação de sintomatologia clínica das aves, onde pode ter outros fatores envolvidos além do *Mycoplasma spp.* As médias dos títulos sorológicos das propriedades avaliadas para MG e MS que afetam o sistema respiratório estão descritas na figura 1.

Figura 1. Média dos títulos sorológicos pela avaliação do ELISA das propriedades avaliadas para MS e MG

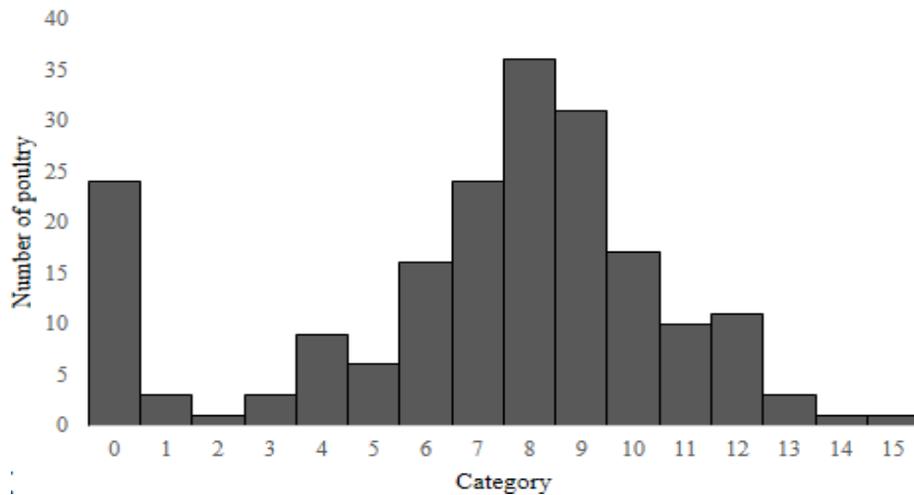


As médias foram construídas em aves de 12 a 54 semanas de idade

Pela orientação do fabricante dos kits de ELISA valores de titulação acima de 1077 são consideradas soropositivas para MG e MS. Dessa forma quando se avalia média populacional é possível notar que todas as propriedades reagiram para MS (100%) e apenas as propriedades P2, P10 e P16 não reagiram para MG (15%).

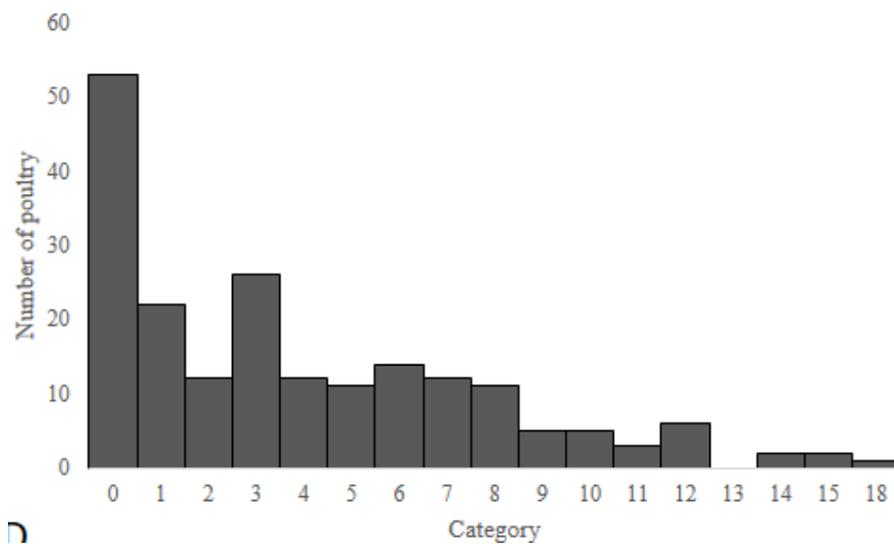
Além da avaliação da média dos títulos sorológicos foram construídos os histogramas para melhor avaliação das doenças nas propriedades. Para isso os títulos foram divididos em categorias exatamente como recomendados pelo fabricante. Um histograma geral títulos sorológicos para MS e MG podem ser visualizados nas figuras 2 e 3, respectivamente.

Figura 2. Distribuição dos títulos em categorias para MS



* As categorias foram divididas da seguinte forma para MS: 0: Títulos de 0 a 1076 (considerado negativo). A partir da categoria 1 os títulos são considerados positivos: categoria 1: Títulos de 1077-1499, 2: Títulos de 1500 a 1999, 3: Títulos de 2000 a 2999, 4: Títulos de 3000 a 3999, 5: Títulos de 4000 a 4999 e assim por diante.

Figura 3. Distribuição dos títulos em categorias para MG



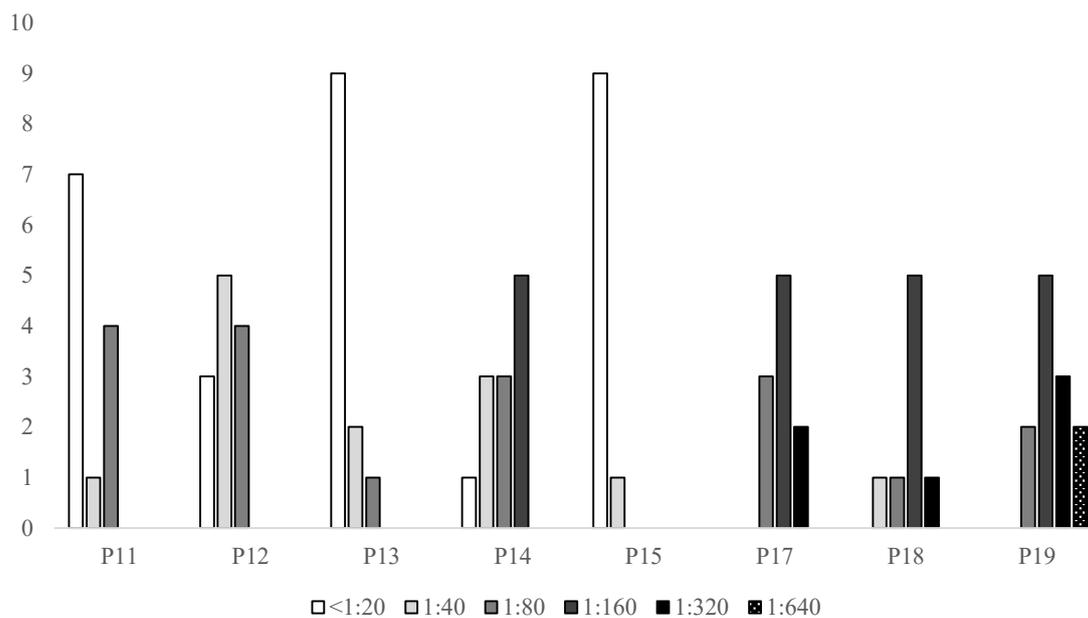
*As categorias foram divididas da seguinte forma para MG: 0: Títulos de 0 a 1076 (considerado negativo). A partir da categoria 1 os títulos são considerados positivos: categoria 1: Títulos de 1077-1499, 2: Títulos de 1500 a 1999, 3: Títulos de 2000 a 2999, 4: Títulos de 3000 a 3999, 5: Títulos de 4000 a 4999 e assim por diante.

Pode ser observado um número significativo de aves reagentes para as doenças pesquisadas. Foram negativas, 24 (12%) e 53 (26%) aves para MS e MG respectivamente. Portanto aproximadamente 88% das aves foram reagentes para MS e 74% para MG. O histograma para MS foi o que apresentou um desvio mais à direita quando comparado à MG, o que significa que há presença de títulos maiores.

5.2 Resultados de HI para MG

Foi realizado prova de HI em 88 amostras das respectivas propriedades 11,12,13,14, 15, 17, 18 e 19. Essas propriedades foram escolhidas aleatoriamente. Os resultados estão sintetizados na figura 4.

Figura 4. Níveis sorológicos para o teste de HI das propriedades avaliadas.



Títulos menores de 1:20 são considerados negativos, 1:40 considerados suspeitos e acima de 1:80 são considerados positivos (BRASIL, 2001)

Ao se realizar o teste de diagnóstico de HI foi possível verificar a associação entre o teste de HI e o teste de Elisa para MG. O teste está sintetizado na tabela 2 em que o ELISA obteve sensibilidade de 100%, especificidade de 25%, valor preditivo positivo de 85,7% e valor preditivo negativo de 100%.

Tabela 1. Teste de diagnóstico para Elisa para MG nas propriedades avaliadas

	P HI	N HI
P E	72	12
N E	0	4

P: positivo; N: negativo; p= 0,0008; sensibilidade = 1; especificidade = 0,25; valor preditivo positivo = 0,857;

Valor preditivo negativo: 1; p=0,0008.

5.3 Correlação entre os títulos sorológicos das doenças avaliadas e sinais respiratórios

Em 52% das propriedades (P1, P2, P4, P5, P8, P12, P14, P15, P17, P18) foram observadas sintomas de secreção nasal, espirros e ronqueiras no momento da visita e esse número aumentou para 13 quando foi perguntado ao proprietário se esses sintomas eram recorrentes em até seis meses anteriores a visita (P9, P13, P19).

Tabela 2. Correlação entre sintomas respiratórios e títulos sorológicos

	MS	MG
Sintomas respiratórios e soropositivo para o agente	68,42% (13/19)	75% (12/16)
Correlação (valor de p)	0,724	0,039
Correlação (valor de r)	0,086	0,476

Sintomas respiratórios: Ronqueira, espirro e secreção nasal; a/b: aves soropositivas e com sintoma respiratório/total aves

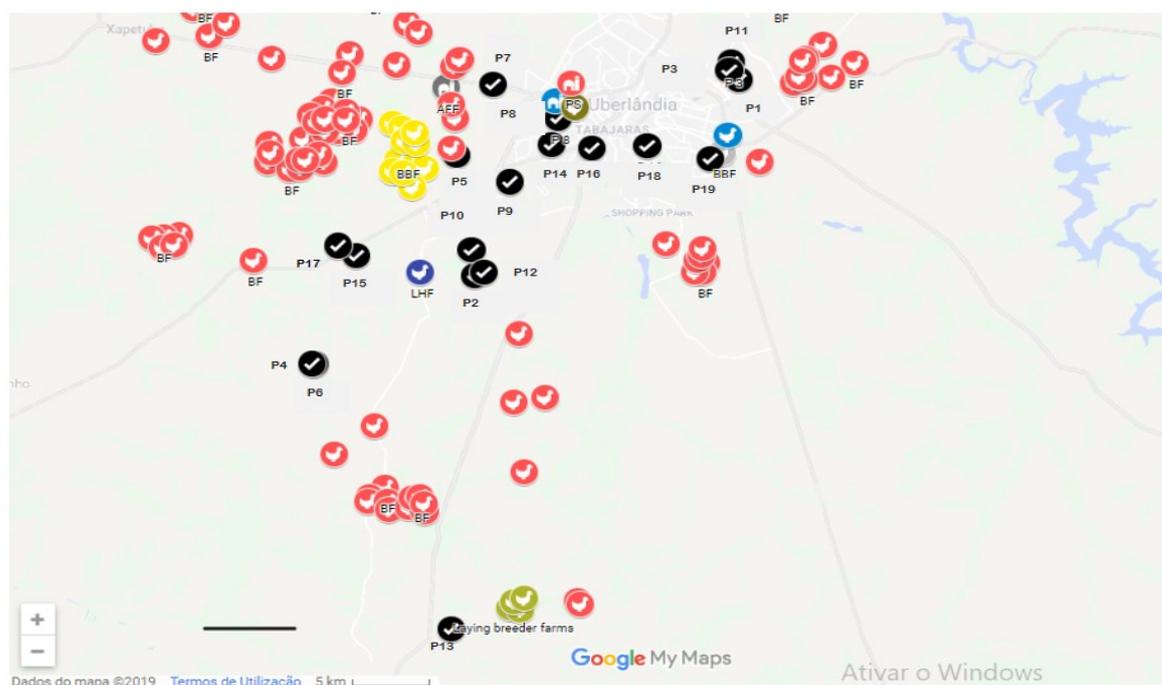
soropositivas; * Não foram considerados lotes onde as aves foram anteriormente vacinadas para IBV (P5, P17, P19)

Foi avaliado também se havia correlação entre títulos sorológicos de MS e MG nas propriedades avaliadas. Não houve correlação entre os títulos das duas doenças ($p=0,336$; $r=0,06$).

5.4 Localização das propriedades avaliadas

Todas as propriedades estudadas se encontram em um raio de 500 metros a 6 km de distância de um ou mais estabelecimentos de atividades avícola industrial (granja de matriz pesada e/ou leve, incubatório, poedeira comercial e granja de frango de corte) (figura 5).

Figura 5. Mapeamento da localização das propriedades avaliadas e estabelecimentos de granjas comerciais.



Fonte: Google Maps



6.DISCUSSÃO

Nas propriedades avaliadas houve 100% de prevalência para MS e 85% para MG. Uma hipótese para esta alta prevalência é relacionada à biossegurança. Como esses lotes de aves caipiras são criados em condições de baixo “status” sanitário (CAVANAGH & NAQI, 2003; OLIVEIRA, 2004) pode haver maior facilidade de disseminação do MG e MS, já que essas bactérias podem ser transmitidas de forma vertical e horizontal, direta ou indiretamente (LEY, 2008), sendo um patógeno de grande relevância, em consequência de sua alta transmissão (EVANS et al. 2005).

O histograma para MS (figura 2) apresentou um desvio mais à direita quando comparado à MG (figura 3), o que significa que há presença de títulos maiores e mostrando que houve um maior número de aves em contato com o MS em relação ao MG, podendo também indicar diferentes tempo de contato entre as aves e os agentes. Em trabalhos realizados no Brasil, são relatadas maiores frequências de infecção pelo MS comparado ao MG (REIS et al., 1973; BUIM, 2005; BUIM et al., 2009).

Não houve correlação entre título sorológico das duas doenças avaliadas ($p=0,336$; $r=0,06$). Isso indica que há diferentes fontes de infecção para MG e MS.

Houve correlação moderada entre a presença dos sintomas clínicos e média de título de MG (tabela 2) com $r= 0,476$. De acordo com Mukaka (2012), um valor de r entre 0,3 e 0,5 indica uma correlação fraca e entre 0,5 a 0,7 uma correlação moderada. Embora o valor de r deste trabalho seja 0,476 que é muito próximo a 0,5, foi considerada uma correlação moderada, pois durante a avaliação da sintomatologia clínica, o critério utilizado foi crítico, e foram consideradas apenas as propriedades que apresentavam mais de 50% das aves com apresentação de sintomas. Portanto, aves com sintomatologia de sistema respiratório têm chances de estarem acometidas por MG, entretanto como a correlação não é forte provavelmente há outros fatores ou agentes associados à sintomatologia clínica. Já os casos que possuíam titulação para MG e não apresentavam sinais clínicos, podem indicar infecção assintomática.

Segundo a OIE (2000) o HI foi considerado o teste sorológico de eleição para MG devido à alta especificidade e assim baixo número de falsos positivos. Porém atualmente no novo manual da OIE (OIE, 2019) há recomendação para realização do ELISA ou HI. Por esse motivo, nesse trabalho, foi realizado um teste diagnóstico que mostra que o HI não deve

ser substituído pelo ELISA, já que esse último apresentou baixa especificidade e valor preditivo positivo (tabela 1). O HI é considerado altamente específico, mesmo para o nível de diferenciação entre cepas (KLEVEN, MORROW & WHITHEAR, 1988). E ainda, há alta concordância entre HI e PCR, tanto para MG, quanto MS (YILMAZ,2011). O alto número de resultados falsos positivos para MG e MS pelo teste de ELISA também foi mencionado por Feberwee (2005). Essa maior especificidade e confiabilidade do HI indica que embora a reação de PCR seja confirmatória, o teste de HI apresenta resultados suspeitos mais confiáveis, diminuindo a necessidade de coleta de amostras de traqueia, que são trabalhosas e estressantes para o animal e aumenta o custos para análise de PCR de lotes com resultado falso-positivo por ELISA. Apesar disso, o ELISA possui maior disponibilidade de kits comerciais padronizados (YUSOFF; TAN, 2001).

Segundo a Instrução Normativa nº 44 de 1998 do Ministério da Agricultura, há distâncias mínimas exigidas entre estabelecimentos industriais, que variam entre 500 metros à 5 km. No caso de matrizeiros é recomendado no mínimo 3 km de distância entre eles. Já para os lotes de controle eventual, é exigido distância mínima de 2 km. Os dados do Mapeamento, indicam que todas as propriedades analisadas neste estudo se encontram a um raio de 500 metros à 6 km de distância dos estabelecimentos de atividades avícolas industrial, o que representa potencial fator de risco para a indústria avícola local, uma vez que todas as propriedades, apresentaram altos títulos de anticorpos.

7 CONCLUSÃO

O MG e MS estão presentes nos lotes caipiras avaliados nesse trabalho. Houve correlação positiva dos sinais respiratórios e a soroprevalência paras MG. Os testes de ELISA e HI obtiveram baixo índice de associação, resultados em vários resultados falso-positivos no ELISA. A proximidade desses lotes com a avicultura industrial pode representar um potencial risco para lotes de controle permanente.

8 REFERÊNCIAS

BARNES, H.J., Lisa K.N. & Vaillancourt J.P. 2008. Colibacillosis, p.691-737. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E. (Eds), **Diseases of Poultry**. 12th ed. Editora Blackwell Publishing, Ames.

BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doenças das aves. Campinas: FACTA**, p. 451-464, 2000.

BRANCO J.A.D. 2004. Manejo pré-abate e perdas decorrentes do processamento de frangos de corte. **Anais Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**. Vol.2, FACTA, Campinas. p.129-142.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, p.68-70, de 24 de agosto de 2001, Seção I.

BUIM, M. R. **Mycoplasma synoviae: diagnóstico, caracterização molecular e interação parasita-hospedeiro**. 2005. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. 70p

BUIM, Marcos Roberto et al. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 552-556, 2009.

CAVANAGH, David; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. **Diseases of poultry**, v. 11, p. 101-119, 2003.

CERDÁ, R. O. *Mycoplasma synoviae*. In: REVOLLEDO, L.; PIANTINO, A. J. **Patologia Aviária**. Barueri: Manoele, cap. 9.2, p. 101-106, 2009

EVANS, J. D. et al. *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. **Journal of applied poultry research**, v. 14, n. 4, p. 757-763, 2005.

FEBERWEE, A. et al. Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. **Avian diseases**, v. 49, n. 2, p. 260-268, 2005.

FIorentin, Laurimar et al. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v. 32, n. 2, p. 213-216, 2003.

GONZALES, E.; MACARI, M.; PAZ, I. C. L. A. Enfermidades metabólicas em frangos de corte. **BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: FACTA**, p. 451-464, 2000.

KLEVEN, S. H.; MORROW, C. J.; WHITHEAR, K. G. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. **Avian diseases**, p. 731-741, 1988.

KLEVEN, S. H.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. R. Reichard, ed. Office International des Epizooties, Paris, France**, p. 512-521, 1996.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J., FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 11th ed, 2003. p. 719-721

KLEVEN, S. H. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1146-1149, 1998.

LEY, D. H. et al. *Mycoplasma gallisepticum*. **Infection. Ames: Iowa State Press**, 2003.

LEY, David H.; YODER JR, H. W. *Mycoplasma gallisepticum* infection. **Diseases of poultry**, v. 12, p. 807-834, 2008.

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. *Mycoplasma gallisepticum*. **REVOLLEDO, L**, 2009.

MINHARRO, Sílvia et al. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2006.

MUKAKA, Mavuto M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.

NASCIMENTO, E. R. *Mycoplasma synoviae* em avicultura, implicações econômicas: conviver ou erradicar. In: **Anais Conferência Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP**. 2001. p. 31.

NASCIMENTO, Elmiro Rosendo et al. Avian mycoplasmosis update. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2005.

NASCIMENTO E.R. & Pereira V.L.A. Micoplasmoses, p.485-500. In: Di Fabio J. & Rossini L.I. (Eds), **Doenças das Aves**. FACTA, Campinas. 2009.

OLIVEIRA, C. Controle da pneumovirose aviária via vacinas: a experiência brasileira. Disponível em: [http](http://). 2004.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

RAZIN, Shmuel; YOGEV, David; NAOT, Yehudith. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REIS, R. et al. Micoplasmoses animais. I. Frequência de *M. meleagridis* e *M. gallisepticum* em perus em Minas Gerais. **Arq Esc Vet Bela Horizonte**, 1972.

ROSALES, A. G. Enfermedades respiratorias en el pollo de engorde: manifestaciones clinicas, etiologia y control. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas/SP**. p. 163-176,1991.

RUSSELL, S. M. The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. **Poultry Science**, v. 82, n. 8, p. 1326-1331, 2003.

SILVA, Rita de Cássia Figueira et al. Mycoplasma synoviae infection on Newcastle disease vaccination of chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 384-389, 2008.

STIPKOVITS, L.; KEMPF, I. Mycoplasmoses in poultry. **Revue scientifique et technique-Office international des épizooties**, v. 15, p. 1495-1526, 1996.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Terrestrial Animal Health Code**. 2000. Disponível em: <<http://www.oie.int/>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Terrestrial Animal Health Code**. 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Terrestrial Animal Health Code**. 2019. Disponível em: <<http://www.oie.int/>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

YAMAMOTO, R. Mollicutes. In: Biberstiein EL, Zee YC, editors. **Review of veterinary microbiology**. Chicago:Blackwell Scientific Publications; p.213-27, 1990.

YILMAZ, F. et al. Detection of Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum in chickens by immunohistochemical, PCR and culture methods. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 162, n. 2, p. 79-86, 2011.