

Micoplasmose aviária

1. Histórico.

Micoplasmas são bactérias pertencentes à classe Mollicutes, família Micoplasmatales. São geneticamente relacionados às bactérias Gram positivas, das quais descendem provavelmente por evolução reductiva que lhes causou a perda de grandes blocos de DNA e consequentemente de muitos genes. Em virtude desta perda de genes os micoplasmas não possuem parede celular e comportam-se como Gram negativos com células diminutas medindo de 0,2 a 0,5 micra, com genoma pequeno contendo de 580 a 1.330 Kpb.

Em condições laboratoriais os micoplasmas apresentam colônias com menos de 1mm de diâmetro e com a forma característica referenciada como de “ovo frito”. São organismo de crescimento lento que normalmente requerem 3 a 5 dias para a formação de colônia mesmo quando adaptados ao cultivo em laboratório. São exigentes em condições de cultivo, sobretudo exigindo meio semi-sintético rico em proteínas e com pelo menos 12% de soro suíno ou eqüino. Alguns micoplasmas aviários possuem peculiaridades que os tornam especialmente difíceis de cultivar, como a exigência de NAD pelo *Mycoplasma synoviae* (MS) e a não fermentação de glicose pelo *Mycoplasma meleagridis* (MM). De forma genérica os micoplasmas são sensíveis ao pH ácido e temperaturas acima de 50°C.

O reconhecimento de micoplasmas como bactérias associadas a animais data de mais de cem anos. Foram primeiramente descobertos na França em 1898, por Edward Nocard e Emile Roux, em um caso de pleuropneumonia bovina. Em 1905, um quadro de “Pneumonia Enzoótica dos Perus”, infecção conjugada de MG e *Pasteurella multocida* foi diagnosticado como sendo provavelmente a primeira identificação de um micoplasma aviário. Durante a década de 1960, os micoplasmas, tidos então como sorotipos de organismos PPLO (Pleuropneumoniae Like Organisms, ou Organismos Semelhantes ao da Pleuropneumonia Bovina), foram reconhecidos como entidades independentes e elevados à condição de espécie. A definição primeiramente de MM como espécie

em 1958 e a imediata descoberta de MG em 1960 e MS em 1964, chamaram a atenção de especialistas em patologia aviária para o possível envolvimento destes organismos em quadros clínicos verificados na avicultura industrial. Desde então as micoplasmoses têm se tornado infecções de maior importância na patologia aviária.

2. Patogenia.

Micoplasmas colonizam preferencialmente epitélios, nos quais se aderem intimamente às paredes celulares do hospedeiro e causam doenças crônicas e infecções de longa duração. Adesinas são os principais fatores de virulência dos micoplasmas, sobretudo as hemaglutininas, responsáveis por sua adesão a hemácias. Hemaglutininas de importância já identificadas são a família pMGA em MG e MSPA e MSPB em MS. Citoadesinas importantes em MG são MGC1, MGC2 e PvpA.

Micoplasmas são hospedeiro-específicos, ou em alguns casos infectam diferentes espécies com estreito relacionamento filogenético, como galinhas, perus e algumas outras espécies de aves domésticas como ocorre com MG e MS. Estes porém, não irão infectar mamíferos e os micoplasmas de mamíferos por sua vez não irão infectar aves.

Convém salientar que nem todo micoplasma é patogênico. As aves possuem espécies saprófitas como o *Mycoplasma gallinarum* e *Mycoplasma galinaceum*, as quais inclusive interferem no diagnóstico quando se tenta isolar micoplasmas da traquéia por terem crescimento mais rápido que MG e MS. Porém, não interferem com o diagnóstico sorológico ou a PCR. O *Mycoplasma immitans* já foi isolado de várias espécies aviárias porém não foi ainda encontrado em galinhas e perus. Este é um micoplasma com muitos antígenos semelhantes a MG e poderá se tornar um problema de diagnóstico se passar a infectar espécies aviárias de interesse econômico.

Um fato notório na patogenia dos micoplasmas é sua transmissão vertical. O número de ovos contaminados é baixo e chega a 5% ou 7% somente nas fases agudas da infecção por MG. Percentuais de transmissão vertical em torno de 0,5% são comumente relatados na literatura e embora pareçam extremamente baixos são o suficiente para a infecção lateral de praticamente todas as aves do lote já nas primeiras semanas de vida. A transmissão vertical dos micoplasmas aviários é um dos principais fatores que fazem dessas infecções objetivos de controle pela vigilância sanitária oficial.

Micoplasmas causam doença por mecanismos indiretos. Estas são bactérias que não possuem exotoxinas que lesam o hospedeiro nem causam septicemia. Algumas enzimas de seu metabolismo como a superóxido dismutase (SOD) já foi identificada como fator de virulência em alguns micoplasmas e também suspeita-se que lipases e proteases por eles excretadas agredam os tecidos do hospedeiro. Porém, em ambos os casos a lesão direta não é de grande extensão.

A patogenia dos micoplasmas depende da ação do hospedeiro. Sobretudo a infiltração tecidual das células de defesa é que causam lesão, sendo que os micoplasmas participam diretamente apenas como antígeno a ser eliminado. A questão fundamental, entretanto, é que os micoplasmas se evadem do sistema imunológico do hospedeiro através de variação antigênica e por aderirem proteínas do hospedeiro em suas membranas. Além disso, não são fortemente imunogênicos e possuem superantígenos, moléculas que causam imunodepressão após a infecção, o que evita a completa eliminação do agente.

Alguns micoplasmas como o MG são tido como patógenos primários, mas a associação com outros patógenos é que faz das micoplasmoses doenças de grande impacto econômico. Os micoplasmas que infectam o aparelho respiratório estão frequentemente associados a *Escherichia coli* e aos vírus da doença de Newcastle e da bronquite infecciosa, enquanto o MS aparece associado a *Staphylococcus aureus* e **enterococos**.

3. Micoplasmas de importância na avicultura.

MG e MS são organismos que causam quadros respiratórios em ambos perus e galinhas, sendo que MS ainda pode causar sinovite em alguns casos. *Mycoplasma meleagridis* (MM) e *Mycoplasma iowae* (MI) são patógenos importantes em perus apenas, ambos envolvidos em quadros respiratórios e síndromes generalizados com envolvimento do aparelho locomotor. Entre todos citados acima, o MG tem sido o micoplasma de maior preocupação devido ao seu potencial em causar impacto negativo sobre a produção. Entre os micoplasmas aviários, este é o único que consta de listas da OIE (Office International des Epizooties), o qual compõe a Lista B juntamente com outros organismos de preocupação, imediatamente após aqueles com capacidade de causar danos imensos independentemente das fronteiras geopolíticas e que compõem a Lista A.

MG causa doença respiratória crônica em galinhas, preferencialmente na forma de aerossaculite e em perus também na forma de sinusite infecciosa. Os sinais clínicos aparecem na forma de estertores respiratórios, secreção nasal, edemaciação da face, queda da produção de ovos e da eclodibilidade, condenação de carcaças e redução da eficiência alimentar. Quadros variantes assintomáticos ou de queratoconjuntivite e encefalite já foram observados em galinhas, embora não sejam ocorrência corriqueiras. As **lesões macroscópicas aparecem como** edemaciação dos seios infra-orbitais em perus e opacidade dos sacos aéreos em galinhas e perus. Quando complicada com *E. coli* aparecem pneumonia fibrinosa, pericardite e perihepatite e depósito caseoso nos sacos aéreos. Ao exame histológico se verifica infiltração mononuclear e hipertrofia das glândulas mucosas.

O MS está envolvido em quadros de sinovite infecciosa em galinhas e perus. A forma mais comum da infecção, porém, é uma infecção subclínica do trato respiratório. Como sinais clínicos aparecem leves estertores respiratórios e dificuldade de locomoção quando da ocorrência de sinovite. Os sinais respiratórios são exacerbados pelos vírus da bronquite infecciosa e da doença de Newcastle e os problemas do aparelho locomotor são freqüentemente complicados por *S. aureus* e enterococos. As lesões macroscópicas verificadas freqüentemente são

edemaciação e acúmulo de exsudato nas bolsas sinoviais e opacidade dos sacos aéreos, porém não são raros os quadros sem lesão macroscópica alguma. Ao exame histológico se pode verificar infiltração de heterófilos e fibrina na bainha sinovial e infiltração de heterófilos e mononucleares nos sacos aéreos.

O MM é um patógeno que causa aerossaculite em perus. Quando infectados em vida embrionária apresentam alterações do aparelho locomotor chamadas de Síndrome TS-65. Os sinais são respiratórios porém pouco freqüentes. Nos embriões infectados pode-se observar baixa mortalidade porém alta morbidade, resultando em aves com deformidades ósseas em alta freqüência.

O MI causa especialmente morte embrionária em perus. Um quadro clínico não é verificado em perus infectados em idade adulta. Quando infectados na vida embrionária apresentam problemas do aparelho locomotor semelhantes ao Síndrome TS-65 causado por MM. Os sinais resumem-se a baixa eclodibilidade e dificuldade de locomoção. As **lesões macroscópicas em embriões** não são patognomônicas e se resumem a definhamento, hepatite, splenomegalia e edemaciação, com **lesões microscópicas de** infiltração de heterófilos e edema do baço e infiltração de macrófagos e heterófilos no aparelho digestivo.

4. Controle das micoplasmoses.

Devido ao permanente gasto com medicamentos e vacinas, o ideal é criar aves livres de micoplasmas. Além de se evitar as perdas diretas com a doença isto ainda zela pelo conceito do estabelecimento, uma vez que o mercado de aves vivas monitora as contaminações por micoplasmas. A característica da transmissão vertical justifica esforços para evitar a infecção, que uma vez instalada seria de difícil eliminação bem como seu impacto se multiplicaria nos extratos seguintes da produção. A obtenção de aves certificadamente livres de micoplasmas aliada à sua subsequente criação em granjas que adotam práticas adequadas de biossegurança (sobretudo o perfeito manejo de isolamento da granja e dos núcleos) deve ser suficiente para a manutenção do estado de livre de micoplasmas do plantel. Algumas vezes, porém, sobretudo com MS, uma granja

sem histórico de infecção aparece repentinamente positiva nos testes sorológico. O MS parece ter uma capacidade de transmissão entre granjas e um período de latência no hospedeiro maior que aquele descrito na literatura científica.

Além da biossegurança, um programa de monitoramento que identifique precocemente as infecções por micoplasmas é imprescindível para se reduzir as perdas causadas pelos micoplasmas. A detecção da infecção por micoplasmas pode ser feita de forma direta, na qual se demonstra o patógeno ou seus constituintes na ave, ou na forma indireta, quando se detecta a manifestação da ave indicando a presença do patógeno. A detecção direta é praticada basicamente por PCR de suabes de traquéia e outros órgão suspeitos de albergarem micoplasmas, ou de tentativas de isolamento do agente em exames bacteriológicos de suabes de traquéia ou outros tecidos. A detecção indireta se baseia especialmente em testes sorológicos, porém o exame histológico e o acompanhamento das taxas de ovos bicados no incubatório tem importância em alguns casos, sobretudo quando técnicas laboratoriais não estão disponíveis localmente.

O monitoramento de matrizes consiste de soroaglutinação rápida (SAR), Inibição da Hemaglutinação (HI) e Elisa, os quais são aplicados em amostragens de 100 a 300 soros, dependendo da idade das aves e o micoplasma monitorado, repetidos com intervalo máximo de 12 semanas. O isolamento do agente pode ser realizado a partir de suabes de traquéia ou da fenda palatina e dos sacos aéreos e articulações de aves reagentes nos teste sorológicos. Não há uma perfeita correlação entre a sorologia e o isolamento do agente, por isso se recomenda a tentativa de isolamento de micoplasmas em pelo menos 10 aves obtidas aleatoriamente no lote. Entre as diferentes técnicas de identificação de micoplasmas estão a inibição do crescimento, imunofluorescência, imunoperoxidase, Elisa e PCR.

É importante ressaltar que para o transporte de aves vivas no país e para exportação de aves ou ovos férteis faz-se necessário o monitoramento oficial dos plantéis avícolas (realizado em laboratórios credenciados ou da rede do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para Salmoneloses, Micoplasmoses e Doença de Newcastle). No Brasil, a normatização das ações de acompanhamento

da saúde dos plantéis avícolas está sendo realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) foi estabelecido pela Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994, sendo o organismo ao qual os produtores de avós e matrizes devem se reportar. Como um programa oficial, o PNSA dá respaldo técnico a organismos internacionais com relação a saúde dos plantéis avícolas no Brasil.

Em algumas situações a manutenção de granjas livres de micoplasmas não é de fácil obtenção. Em alguns estratos da produção, como as granjas produtoras de ovos para o consumo humano e frangos de corte, outras formas de controle se fazem necessárias para a redução do impacto da doença sobretudo o uso de antimicrobianos e de vacinas.

Os micoplasmas são sensíveis a vários princípios ativos de antimicrobianos. Clortetraciclina, oxitetraciclina, tilosinas, quinolonas e tiamulina são os mais utilizados atualmente, seja em regime de uso contínuo ou pulsos mensais em reprodutoras. Convém lembrar que o uso em frangos de corte é vantajoso quando feito na primeira semana de vida caso o lote seja oriundo de matrizes infectadas por MG. O tratamento para MS depende de uma observação específica de cada caso, já que muitas vezes este micoplasma não acarreta perdas facilmente quantificáveis em frangos e poedeiras. Convém lembrar que o uso contínuo de qualquer antibiótico irá selecionar cepas resistentes, e que a veiculação de resíduos em carcaças apresenta implicações de saúde pública e deve ser evitada através da observação dos períodos de carência.

Uso de vacinas para micoplasmas pode variar desde a meta de produzir mais ovos para consumo humano até a abordagem ecológica da substituição de cepas selvagens por cepas vacinais. Para micoplasmas, parte do sistema produtivo necessita evitar a doença (produção de ovos) enquanto a outra parte necessita eliminar as cepas selvagens e auxiliar na erradicação do agente (plantéis básicos). Especialmente para MG, as vacinas tem sido eficientes em ambas as situações.

Na produção de ovos as vacinas para MG são largamente utilizadas com sucesso. Nesse setor a manutenção de granjas de múltiplas idades e que alojam pintos ou frangas criadas de diferentes origens, aliado à deficiente

biosseguridade da própria granja, praticamente impossibilita a criação de aves livres de micoplasmas, forçando a vacinação. Por muitos anos a vacinação com micoplasmas viáveis da cepa F de MG tem sido utilizada em poedeiras, porque o ganho na produção de ovos favorece a relação custo benefício para o produtor. Sua maior deficiência é ter certa virulência para perus e pintinhos, mas mesmo assim isso não é muito problemático porque regiões produtoras de ovos não são em geral regiões de criação de perus, e porque a recria de reposição pode ser feita em outra granja ou em núcleo isolado na mesma granja, reduzindo a possibilidade de infecção de pintinhos. Mesmo quando isso ocorre, a infecção ainda se dá por uma cepa vacinal, o que representa uma vantagem em relação a cepas selvagens.

A cepa F porém, está sofrendo redução em seu uso. Essa observação se explica mais pelo surgimento de vacinas vivas menos virulentas. Recentemente surgiram no mercado as cepas ts-11 e 6/85 de MG, as quais não têm a virulência residual que pode causar sinergismo com infecções virais ou mesmo com a vacinação com alguns vírus vivos e oferecem maior segurança quanto à possíveis doses elevadas oriunda de acidentes na vacinação. Essas vacinas ainda tem baixa transmissão horizontal e não causam resposta sorológica intensa, permitindo uma avaliação da ocorrência paralela da infecção por cepas de campo através de sorologia. Ambas vacinas têm sido demonstrado serem causadoras de fraca resposta de anticorpos nas aves vacinadas, consequentemente resultando em fraca reação tanto em soroaglutinação rápida como em Elisa. A resposta sorológica à vacinação com a cepa 6/85 é praticamente negligenciável, permitindo detectar a possibilidade da infecção concomitante do lote por cepas de campo através de testes sorológicos.

Tão logo a cepa F de MG começou a ser utilizada, foi identificado que havia substituição das amostras de campo pela amostra vacinal nos lotes infectados, indicando que o controle populacional de micoplasmas no ambiente era possível de ser feito através da vacinação dos lotes. Recentemente foi demonstrado, experimentalmente, que as vacinas 6/85 e ts-11 não causavam a substituição da amostra R (francamente virulenta) em galinhas, porém em experimentos a campo foi demonstrado que a vacinação com a cepa ts-11 eliminou a cepa F do plantel,

acenando para a possibilidade da erradicação de micoplasmas através do uso escalonado de vacinas. Estas observações indicam que, uma vez contaminada por uma amostra de campo, a granja pode ser restabelecida ao estado de livre de MG pela contínua introdução de aves vacinadas. A granja deve receber várias gerações de aves vacinadas com a cepa F para eliminação das amostras silvestres altamente virulentas. Uma vez eliminadas as cepas de campo, a própria cepa F poderá ser eliminada pelo uso das vacinas com as cepas ts-11 ou 6/85, e quando da certificação de que ambas, as cepas de campo e a cepa F, forem completamente eliminadas pode-se tentar a suspensão da vacinação e o conseqüente restabelecimento da granja como livre de micoplasmas. As confirmações de que as amostras virulentas foram eliminadas podem ser feitas por sorologia e tentativas de isolamento, e a comparação das amostras isoladas feita com base em técnicas de genética molecular. Este procedimento, no entanto, necessita ser testado em larga escala, inclusive em matrizes, para sua aplicação com maior segurança. A decisão de suspender a vacinação é, no entanto, de alto risco em granjas de idades múltiplas ou com outro fator que cause baixa biossegurança. A manutenção da vacinação, por outro lado, garante a permanência de cepas vacinais na granja impedindo a ocorrência de infecções com amostras de campo.

As bacterinas possuem também suas vantagens. A utilização de antibioticoterapia não interfere com as bacterinas, o que poderia ser um problema com as cepas vivas se ambos a vacinação e a terapia tiverem de ser feitas simultaneamente. Quando necessário suspender a vacinação as bacterinas são simplesmente descontinuadas com a interrupção das novas vacinações, enquanto as cepas vivas permanecem na granja, podendo interferir no diagnóstico. Essas situações são especialmente importantes quando uma granja está contaminada com ambos MG e MS, quando o tratamento para MS pode interferir na vacinação para MG e as tentativas de isolamento de MS podem resultar repetidamente em isolamento da cepa vacinal de MG. O isolamento de MG é sempre mais fácil, uma vez que este é menos exigente em condições de crescimento em laboratório.

Outra novidade recente foi o aparecimento da vacina viva, mutante termo-sensitiva atenuada para MS (cepa MS-H). A sua utilização em larga escala,

entretanto, estará na dependência de melhor esclarecimento quanto ao real impacto de diferentes cepas de MS em patologias que afetam as aves de exploração comercial. Essa vacina ainda não está comercialmente disponível no Brasil, mas a exemplo de outros países deverá ser aprovada para uso. A demonstração de que a vacinação com MS-H tem efeito benéfico sobre patologias dos aparelho respiratórios e locomotor, e/ou que auxilie em programas de erradicação de MS, especificamente com relação às cepas que ocorrem no Brasil, seria de enorme importância.

O impacto econômico da infecção por MS é difícil de estabelecer na prática. A literatura específica também não auxilia muito porque apresenta dados contraditórios. Um estudo com poedeiras nos Estados Unidos da América revelou facilmente a redução da produção de ovos causada pela infecção por MG, porém não conseguiu identificar redução alguma nos plantéis infectados por MS. Resultados semelhantes também foram obtidos em outro estudo recente. Outros autores, porém, sugerem uma redução de 10 ovos por galinha alojada quando infectadas por MS. A literatura também carece de comparação do impacto na produção causado por cepas de MS com virulências diferenciadas. No Brasil, a dificuldade em se identificar na produção as perdas causadas por MS, sobretudo em plantéis de matrizes, tem gerado o conceito de que este é um patógeno secundário em importância.

As vacinas para micoplasmas não devem ser utilizadas em plantéis sujeitos ao controle oficial. Plantéis básicos são controlados pelos órgãos públicos de vigilância em vários países, para a certificação da ausência do patógeno. Tanto as cepas vivas como as bacterinas interferem com esse controle por causarem resultados positivos em sorologias (bacterinas) e isolamento de micoplasmas (cepas vivas), dos quais os plantéis dependem de repetições de testes com resultado negativos para serem certificados como livres de micoplasmas. No Brasil, a Instrução Normativa 26 do Mapa estabelece as normas a serem seguidas pelos plantéis de matrizes. Entre essas, destaca-se a proibição do uso de vacinas para micoplasmas.