

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Salmonelose e micoplasmose em aves domésticas criadas em fundo de quintal
no município de Patos - PB

Raizza Barros Sousa Silva

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Salmonelose e micoplasmose em aves domésticas criadas em fundo de quintal
no município de Patos - PB

Raizza Barros Sousa Silva
Graduanda

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo
Orientador

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo
Co-orientadora

Patos, Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RAIZZA BARROS SOUSA SILVA
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM 18/02/2013

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo

Profa. Dra. Patrícia Araújo Brandão

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo

Dedico este trabalho à minha família, nela sei que posso encontrar conforto e incentivo nos momentos mais difíceis, além compartilhar as conquistas e alegrias. Em especial aos meus pais, Neide e Itamêr, aos meus irmãos, Júnior, Danthe, Julianne, Ana Stella e Jéssica, à minha sobrinha, Cecille, e a George, por seu companheirismo. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Este é o espaço de reconhecimento e agradecimento a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste meu sonho. São muitos os que fizeram parte desta caminhada, e se acontecer de esquecer algum nome, me perdoem, trata-se da ansiedade do momento. A todos, meu muito obrigada!!!

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me abandonar e sempre aumentar a minha fé Nele, por iluminar e guiar os meus pensamentos e acalmar o meu coração nos momentos de angústia e desespero.

Aos meus pais, Gilvaneide Maria Barros Sousa Silva (Neide) e José Itamêr Silva (Itamêr), por serem minha fortaleza e nunca deixarem faltar nada na minha vida e na de meus irmãos, nos apoiando sempre. São exemplo de dedicação, seriedade e honestidade. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Júnior, Danthe, Julianne, Ana Stella e Jéssica, por sempre estarem presente em minha vida. Amo vocês!

À minha sobrinha, linda e amada, Cecille; que possui um sorriso maravilhoso, o qual faz com que eu esqueça todos os meus problemas. Amo-te, minha neguinha!

A George, pelo seu amor, carinho e companheirismo; e à sua família, por me acolher tão bem.

Aos meus avôs José de Sousa Araújo (In memoriam), Francisca Barros Araújo, Manoel Doca de Oliveira (In memoriam) e Ana Nair Silva. Aos Meus tios, tias, primas e primos. Em especial, a Tia Leir e a minha prima-irmã Débora.

Às minhas amigas Ana Lucélia, Lilianne, Raiara e Vanessa pela ajuda nas coletas de material, pelo dia-a-dia, pela amizade e companheirismo. Adiciono também nesta lista: Fabíola e Isabelle. Vocês foram verdadeiras irmãs. Espero sempre tê-las na minha vida!

Aos demais colegas de faculdade, desejo a todos muito sucesso profissional e pessoal, em especial aos meus amigos Raiara, Lilianne, Suzanna, Piêtro, Gustavo, Maira Pollyanna, Luma... A Maira pela ajuda na burocracia no fim de curso, muito abrigada, amiga.

Ao Pessoal que também ajudou para o desenvolvimento do projeto: Rabay e sua família; produtores/criadores das aves, que tão gentilmente nos cederam os animais.

Ao laboratório LADA, pela colaboração na realização do teste ELISA.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo, pela orientação e ensinamentos. E aos demais Professores que fizeram parte da minha formação acadêmica, me passando seus conhecimentos. Ao Prof. Dr. Olaf Andreas Bakke pelas orientações na estatística. Aos professores Dra. Marcia Almeida de Melo, Dra. Patrícia Araújo Brandão e Dr. Sérgio Santos Azevedo pela participação na banca e sugestões para a monografia.

A todos os Funcionários da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos, em especial a Tereza de Jesus Dias de Lima Nóbrega e Damião (Damis Night), sempre prestes a ajudar. E aos motoristas, pela colaboração e paciência durante as coletas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Micoplasmose Aviária: <i>M. gallisepticum</i> (MG) e <i>M. synoviae</i> (MS).....	14
2.1.1 Etiologia	14
2.1.2 Epidemiologia	15
2.1.3 Patogenia.....	16
2.1.4 Sinais Clínicos	16
2.1.5 Patologia	17
2.1.6 Diagnóstico	17
2.1.7 Diagnóstico Diferencial	18
2.1.8 Tratamento, Prevenção e Controle.....	18
2.2 Salmonelose Aviária - <i>Salmonella</i> spp.	19
2.2.1 Etiologia e Classificação Taxonômica.....	20
2.2.2 Pulrose.....	20
2.2.3 Tifo aviário.....	22
2.2.4 Paratifo aviário	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Locais das Atividades	25
3.2 Amostragem	25
3.3 Propriedades e Animais.....	26
3.4 Coleta das Amostras.....	27
3.5 Questionário	28
3.6 Exames Laboratoriais.....	28
3.7 Estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa e Ensaio imunoenzimático (ELISA-indireto) para diagnóstico de *Salmonella Pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves de "fundo de quintal" criadas no município de Patos, Paraíba. 30
- Tabela 2.** Sororreatividade das aves simultaneamente à Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e ao Ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) no município de Patos, Paraíba. 32
- Tabela 3.** Sororreatividade das aves simultaneamente à Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e ao Ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de *Mycoplasma synoviae* (MS) no município de Patos, Paraíba. 32
- Tabela 4.** Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas presas em galinheiros no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... 34
- Tabela 5.** Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas em regime semi-intensivo no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA)..... 35
- Tabela 6.** Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas soltas no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA-indireto)..... 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do município de Patos-PB e a localização das regiões onde houve coletas.
1- Distrito de Santa Gertrudes; 2- Sítio Mucambo de Baixo; 3- Bairro Maternidade; 4- Bairro Jatobá. 26
- Figura 2.** Contenção das aves. 2.a- Guiné; 2.b- Galinha. 27
- Figura 3.** Coleta de sangue por meio da punção da veia umeral em ave. 3.a- Veia umeral; 3.b- Coleta de sangue por punção da veia umeral..... 28

APÊNDICE

APÊNDICE I -	Total de aves coletado por propriedades e por espécie e o número estimado de aves em cada propriedade.....	41
APÊNDICE II -	Questionário.....	42
APÊNDICE III -	Teste de Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa (BRASIL, 2002).....	43
APÊNDICE IV -	Kit de ELISA para detecção de anticorpos contra <i>Mycoplasma</i> sp.....	45

RESUMO

SILVA, RAIZZA BARROS SOUSA. Salmonelose e micoplasmose em aves domésticas criadas em fundo de quintal no município de Patos - PB. Patos, UFCG. 2013 47p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária).

Foi realizado um levantamento de salmonelose e micoplasmose em aves de “fundo de quintal” procedente de 11 propriedades no Município de Patos, Estado da Paraíba. Para tanto, foram coletadas 153 amostras de soro para o diagnóstico sorológico. Foram utilizados os testes de Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA- indireto). Dentre as 153 aves examinadas, 112 (75,17%) apresentaram sorologia positiva para *Salmonella Pullorum* (SP) com soro bruto e 108, na diluição de 1:10. Para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), 128 (83,66%) reagiram a SAR e 56 (36,60%) ao ELISA e para *M. synoviae* (MS), 121 (79,08%) e 101 (66,01%) aves reagiram para SAR e ELISA, respectivamente. Todas as propriedades estudadas apresentaram animais sororreagentes ao SP, MG e MS na SAR. Já no ELISA apenas uma propriedade não teve aves reagentes para MG. Os resultados indicaram que tais microrganismos estão amplamente difundidos nas criações informais de aves.

Palavras-chave: aves, doenças, epidemiologia, sorologia.

ABSTRACT

SILVA, RAIZZA BARROS SOUSA. Salmonellosis and mycoplasmosis in backyard poultry reared in the county of Patos - PB. Patos, UFCG. 2013 47p.
(Work Completion of Veterinary Medicine course)

A survey of salmonellosis and mycoplasmosis in "backyard" poultry derived from 11 properties in the county of Patos, Paraíba State. To this end, we collected 153 serum samples for serological diagnosis. The samples were tested by Agglutination Test Rapid (SAR) on board and Immunoenzymatic Assay (ELISA-Indirect). Among the 153 poultry examined, 112 (75,17%) had a positive serology for *Salmonella Pullorum* (SP) with crude serum and 108, in 1:10 dilution. For *Mycoplasma gallisepticum* (MG), 128 (83,66%) responded to the SAR and 56 (36,60%) ELISA and *M. synoviae* (MS) 121 (79,08%) and 101 (66,01%) poultry responded for SAR and ELISA, respectively. All properties studied had seropositive animals to SP, MG and MS by SAR. Only one property had no reagent birds for MG by ELISA. The results indicated that such microorganisms are widespread in poultry informal creations.

Key words: poultry, diseases, epidemiology, serology.

1. INTRODUÇÃO

Durante toda história do Brasil, sempre existiu uma avicultura tradicional e familiar, conhecida popularmente como produção de “frango caipira” ou de “aves de fundo de quintal”, com especial destaque para a região do semiárido nordestino.

Segundo Albino et al. (2005), a produção de aves caipiras está em torno de 80% das propriedades rurais existentes no Brasil e em sua grande maioria são pequenos produtores que produzem carne e ovos para consumo próprio, comercializando os excedentes. Atualmente, essa produção vem aumentando e se aperfeiçoando cada vez mais, sendo uma realidade nacional.

O Brasil é o terceiro maior produtor de frango do mundo, produzindo 13,058 milhões de toneladas em 2011, apresentando um crescimento de 6,8% em relação a 2010 (UBABEF, 2012). Em 2002, o país produziu 7,5 milhões de toneladas de frango, enquanto que em 2010 foi 12,3 milhões de toneladas (ANUALPEC, 2011). Isto se deve a muitas condições que favorecem a atividade avícola como: clima tropical, disponibilidade de terras agricultáveis para o plantio de grãos, mão-de-obra disponível, ciência e tecnologia voltadas para o setor, e mercado consumidor em expansão.

Em prol do crescimento da cadeia produtiva e a fim de garantir a segurança sanitária e alimentar da população o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e as indústrias trabalham com medidas de vigilância para manter um bom status sanitário. Porém estas medidas não abrangem as aves de fundo de quintal, animais que são criados geralmente para consumo próprio e comercialização local, podendo levar perigo às criações industriais e à população.

Os gêneros *Mycoplasma* e *Salmonella* são patógenos bacterianos importantes nas criações avícolas, pois são algumas das principais causas de perdas na produção brasileira. Os prejuízos das micoplasmoses se resumem à queda na produção e qualidade dos ovos, baixa eclodibilidade, alta taxa de pintos desprezados, queda no ganho de peso, condenação de carcaças, resistência bacteriana e restrições comerciais.

As salmoneloses aviárias não causam tantos prejuízos econômicos quando comparada com as micoplasmoses, porém como se trata de uma zoonose, se faz necessária a condenação das carcaças contaminadas devido ao risco de toxinfecção alimentar em humanos.

A micoplasmose e a salmonelose fazem parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), o qual preconiza acompanhamento sorológico e periódico das granjas através da Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa como teste de triagem para o diagnóstico destas enfermidades (BRASIL, 2009).

O conhecimento da ocorrência de infecções bacterianas em aves de “fundo de quintal” pode ter grande utilidade para indicar a necessidade de medidas de controle e prevenção, visto que esses agentes disseminam-se por mecanismos de transmissão horizontal e vertical infectando grande variedade de aves domésticas e de vida livre, com ou sem manifestação clínica.

Devido aos prejuízos causados pelo *Mycoplasma gallisepticum* (MG), o *Mycoplasma synoviae* (MS) e a *Salmonella* spp. na produção avícola e pela escassez de dados sobre estes microrganismos no município de Patos, Estado da Paraíba, realizou-se uma investigação a respeito da presença de anticorpos contra estes três microrganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micoplasmose Aviária: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS)

A micoplasmose aviária consiste em um conjunto de enfermidades bacterianas infectocontagiosas de caráter crônico e de distribuição mundial, que acomete principalmente galinhas e perus, podendo acometer muitas outras espécies de aves domésticas. Caracteriza-se por problemas respiratórios e articulares, gerando grandes perdas na avicultura brasileira e mundial (CERDÁ, 2009; METTIFOGO; BUIM, 2009).

O primeiro micoplasma foi descoberto na França por Edward Nocard e Emile Roux, em 1898, uma doença respiratória, a pleuropneumonia contagiosa bovina (NOCARD e ROUX, 1898). A partir de 1905 confirmaram a sua presença também nas aves, um provável quadro de infecção conjugada de *Mycoplasma gallisepticum* e *Pasteurella multocida* foi diagnosticado como "Pneumonia Enzoótica dos Perus". Na década seguinte recebeu a denominação de sinusite infecciosa dos perus e doença respiratória crônica (DRC) das galinhas, ambas causadas por *M. gallisepticum* (METTIFOGO; FERREIRA, 2007).

As espécies *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *M. synoviae* (MS) são algumas das mais importantes para a produção avícola (SANTOS et al., 1995; FIORENTIN, 2000). O primeiro é responsável pela Doença Respiratória Crônica (DRC) das galinhas e pela Sinusite Infecciosa dos perus. E o segundo causa tendinite e bursite de forma aguda e crônica, principalmente em galinhas e perus, a chamada Sinovite das Aves. Atualmente tem causado com maior frequência infecção subclínica no trato respiratório superior, podendo evoluir para aerossaculite (AIELLO, 2001; CARDOSO et al., 2006).

2.1.1 Etiologia

O gênero *Mycoplasma* pertence à classe Mollicutes (pele macia) e à ordem Mycoplasmatales. São desprovidos de parede celular (HIRSH; ZEE, 2003), mas possuem

tripla camada de membrana externa flexível. Dessa forma são muito sensíveis a detergentes e desinfetantes, porém não sofrem ação de antibióticos que interferem na síntese bacteriana da parede celular, como a penicilina (QUINN et al., 2005).

São bactérias que possuem vida extracelular e são diminutas, medindo de 0,3 a 0,8mm de diâmetro. São pleomórficas, podendo apresentar-se na forma cocóide, cocobacilares (AIELLO, 2001; SANTOS et al., 1995). Coram-se pelo Giemsa, adquirindo a cor azul, ou por outros corantes similares e quando corados pelo método de Gram, comportam-se como Gram-negativas.

Possui um genoma pequeno se comparado com outras bactérias, o que lhes dá as características de ter o metabolismo reduzido e o crescimento lento. Por tanto, para o seu cultivo, requerem um meio rico em proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e soro animal (REVOLEDO; FERREIRA, 2009). Formam uma colônia característica que apresenta uma zona central densa, elevada e que penetra no meio de cultura, dando um aspecto mamilar ou de “ovo frito”.

2.1.2 Epidemiologia

Segundo Revoledo e Ferreira (2009), a micoplasmose aviária possui distribuição mundial e seus agentes podem ser isolados de aves domésticas e silvestres. O MG e o MS possuem como principais hospedeiros as galinhas e os perus, no entanto já foram isolados de patos, gansos, pombos, pardais, entre outros; demonstrando a habilidade dos mesmos em se adaptar a outras espécies de hospedeiros.

O período de incubação da doença, a morbidade e a mortalidade são influenciados pela virulência da cepa envolvida, pelo número de microrganismos presentes, envolvimento de outros patógenos, pela porta de entrada, por características do hospedeiro, como idade e espécie, além de fatores como estresse e manejo.

Devido às formas de transmissão, em geral, a micoplasmose possui uma alta morbidade. Já a mortalidade é relativamente baixa, ficando em torno de 5%, podendo alcançar percentagens mais altas, por exemplo, 70 a 80% na enfermidade causada pelo MS e a 30% quando causada pelo MG, assumindo um caráter mais grave. O período exato de incubação é difícil determinar, porém, experimentalmente, pode variar de seis a 21 dias na

DRC das galinhas e na sinusite infecciosa dos perus; e de 11 a 21 dias na sinovite das aves (CERDÁ, 2009; METTIFOGO; BUIM, 2009).

O MG e MS podem ser transmitidos de forma horizontal e vertical. A forma horizontal é a mais comum, podendo ocorrer diretamente por meio de aerossóis, de ave para ave, ou indiretamente por fômites. A transmissão também ocorre por meio de pássaros silvestres e de roedores. A forma vertical é por meio de ovos infectados, ocorrendo uma transmissão transovariana; motivo pelo qual é difícil conseguir controlar e erradicar essa doença (METTIFOGO; BUIM, 2009; CERDÁ, 2009; BUCHALA et al., 2006).

2.1.3 Patogenia

Os primeiros estágios de interação entre o *Mycoplasma* e o hospedeiro incluem uma série de eventos sequenciais: um primeiro contato não-específico, a aderência específica aos receptores, a colonização e os danos subsequentes à célula (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Segundo Timenetsky (2009), Berchieri Júnior e Macari (2000), os micoplasmas preferem as superfícies celulares, se aderem diretamente e intimamente às células da mucosa respiratória, digestiva, genito-urinário e às células do tecido articular para obter os nutrientes e, conseqüentemente, causam diversos tipos de alterações. Os metabólitos clássicos como o peróxido de hidrogênio e a amônia são suficientes para provocar danos oxidativos aos constituintes vitais da célula hospedeira.

2.1.4 Sinais Clínicos

Os principais sintomas da DCR das galinhas são corrimento nasal, estertores respiratórios (ronqueira), tosses, espirros e dificuldade respiratória, acarretando perdas na produção devido ao baixo ganho de peso, queda na produção e qualidade dos ovos, baixa eclodibilidade, alta taxa de pintos desprezados, condenação de carcaças e resistência bacteriana (DORN, 1973; GAMA et al., 2005). Em perus, na sinusite infecciosa, a

inflamação dos seios infraorbitários é o mais característico, podendo ocorrer tumefação uni ou bilateral com massas caseosas ou líquido fétido (METTIFOGO; BUIM, 2009).

De acordo com Aiello (2001), as aves doentes podem não apresentar nenhum sinal, exceto quando estão estressadas ou acometidas com outras enfermidades. Podendo estar associado com vírus respiratórios e/ou *Escherichia coli*, recebendo a denominação de DCR complicada (BERCHIERI JÚNIOR; MACARI, 2000).

Na maioria dos casos de sinovite das aves a enfermidade é subclínica, afetando a parte alta do aparelho respiratório. Porém na forma septicêmica os sinais exacerbam-se e é possível observar os transtornos locomotores tanto em galinhas como em perus, sendo o inchaço das articulações e a claudicação os sinais mais visíveis (CERDÁ, 2009).

2.1.5 Patologia

Macroscopicamente na micoplasmose aviária são encontrados sinusite, faringite, traqueíte, além de inflamação catarral nos brônquios e exsudato fibrino-caseoso nos sacos aéreos, quando atingidos. Lesões mais graves resultam em septicemia, com pericardite, peri-hepatite e lesões no sistema articular e reprodutor (CERDÁ, 2009; METTIFOGO; BUIM, 2009).

Segundo Aiello (2001), as membranas mucosas ficam espessadas, hiperplásicas, necróticas e infiltradas com células inflamatórias. No sistema respiratório, observa-se muco seguido de descamação do epitélio ciliado com perda dos cílios, como descrito por Mettifogo e Buim (2009).

2.1.6 Diagnóstico

A SAR é um teste de grande sensibilidade para detectar os anticorpos, rápido, pouco dispendioso e simples, mas que se caracteriza pela baixa especificidade (METTIFOGO; BUIM, 2009). É o teste usado como procedimento sorológico inicial e de

predileção para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses, devido às dificuldades em se isolar micoplasmas aviários (CARDOSO et al., 2006).

Os testes de Inibição da hemaglutinação (HI) e de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são utilizados como confirmatórios para resultados positivos na SAR (ROSSINI; MONTEIRO, 2004). O isolamento e a identificação do microrganismo são realizados através do cultivo em meio Frey e de testes bioquímicos, respectivamente. Para a identificação, pode-se também utilizar a imunofluorescência direta ou a técnica de inibição do crescimento (CERDÁ, 2009). A Reação em Cadeia de Polimerases (PCR) é o método de predileção para o diagnóstico definitivo de organismos que são de difícil isolamento, como é o caso dos micoplasmas (METTIFOGO; BUIM, 2009).

2.1.7 Diagnóstico Diferencial

Clinicamente a DCR das galinhas e a sinusite dos perus, causadas pelo MG, devem ser diferenciadas de todas as outras enfermidades que afetam principalmente o trato respiratório superior e inferior. Dentre os diagnósticos diferenciais deve-se considerar a doença de Newcastle, influenza aviária, bronquite, laringotraqueíte e coriza infecciosa.

Laboratorialmente o MS causador da sinovite infecciosa deve ser diferenciado de outros agentes bacterianos e virais causadores de artrite e sinovite, incluindo o MG (CERDÁ, 2009). Dentre as enfermidades semelhantes estão a tenossinovite viral, salmonelose e as infecções estafilocócicas.

2.1.8 Tratamento, Prevenção e Controle

O tratamento da micoplasmose tem como base o uso de antibióticos, como: macrolídeos (tilosina), tetraciclinas, gentamicina, timulina e as fluorquinolonas (enrofloxacina). Ou seja, todos os fármacos antimicrobianos que interferem na síntese dos aminoácidos, ácidos nucleicos e no metabolismo dos lipídios. Porém sua erradicação dificilmente ocorre, há apenas redução da sintomatologia com eliminação do agente,

transmitindo a enfermidade. E no caso de suspensão do tratamento pode haver uma recaída (METTIFOGO; BUIM, 2009). O MS é naturalmente resistente à eritromicina e apresenta perda de susceptibilidade à tetraciclina (CERDÁ, 2009).

Existe também o tratamento de ovos na pré-incubação, com antimicrobianos ou por aquecimento, com a finalidade de reduzir o grau de infecção; porém isso leva a uma diminuição na eclodibilidade (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Visto a dificuldade de eliminar e controlar o micoplasma, a prevenção é o método de escolha, tendo como base a aquisição de animais a partir de reprodutores livres e adoção de medidas de biossegurança. Quando as medidas de biossegurança não são suficientes para evitar a infecção, o uso de antibióticos de forma preventiva pode ser uma forma eficaz para evitá-la; consiste em medicar as aves nos primeiros dias de vida com antibiótico. Outro método preventivo é a vacinação, que reduz os altos gastos com tratamento, diminui as perdas de produção e minimiza as chances de infecções (METTIFOGO; BUIM, 2009; CERDÁ, 2009).

O controle da infecção de um lote pode estar baseado na realização de monitorias sorológicas constantes, como é preconizado pelo PNSA, MAPA (ROSSINI; MONTEIRO, 2004; BRASIL, 1994).

2.2 Salmonelose Aviária - *Salmonella* spp.

O termo salmonelose aviária abrange vários grupos de doenças das aves causadas por agentes do gênero *Salmonella*. Entre as salmoneloses mais comuns encontram-se a pulorose, o tifo e o paratifo aviário, sendo este último de caráter zoonótico. Logo, a salmonelose aviária é importante devido ao impacto econômico na avicultura brasileira e mundial, além do enfoque na saúde pública. E por tais motivos faz parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) (ALBINO, 2005; ANDREATTI FILHO, 2009).

2.2.1 Etiologia e Classificação Taxonômica

Os agentes etiológicos da salmonelose são bactérias do gênero *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae e contém aproximadamente 2500 sorotipos, que podem provocar enfermidades em seres humanos e animais, sendo mais frequentemente encontrados em aves (ANDREATTI FILHO, 2009).

São bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Possuem uma complexa constituição antigênica: antígeno somático “O”, flagelar “H” e/ou capsular “K”. Essas bactérias são destruídas pelo calor, 55°C por 1 hora ou 60°C durante 15 a 20 minutos (SANTOS et al., 1995). As salmonelas são geralmente móveis, com exceção da *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* (QUINN et al., 2005). O pH ótimo de multiplicação fica próximo de 7,0 e com temperatura entre 35 a 37°C, porém valores máximos e mínimos dependem muito do sorotipo (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A classificação e nomenclatura do gênero *Salmonella* causa grande discussão, no entanto, na mais recomendada atualmente o gênero *Salmonella* está classificado em apenas duas espécies, *enterica* e *bongori*. A *Salmonella bongori* contém cerca de 20 sorotipos, é extremamente rara e geralmente isolada de animais de sangue frio. Já a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* contém 1435 sorotipos, entre os quais estão aqueles de interesse para a avicultura e para a saúde pública (ANDREATTI FILHO, 2009).

Dentre as mais importantes estão: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Pullorum (*S. Pullorum*), responsável pela pulorose; *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum (*S. Gallinarum*), causadora do tifo aviário; *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) é um dos agentes etiológicos do paratifo aviário, assim como o sorotipo Typhimurium (BERCHIERI JUNIOR; OLIVEIRA, 2009).

2.2.2 Pulorose

É uma salmonelose de distribuição mundial, que tem como agente etiológico a *Salmonella Pullorum* (SP). Foi descrita pela primeira vez por Rettger em 1899, conhecida inicialmente como diarreia branca bacilar, porém esta nem sempre é um sinal clínico

evidente. É uma doença septicêmica específica de galinhas e perus, podendo afetar faisões, patos, codornas, além de outras espécies como chimpanzés, suínos, vacas e cachorros (REVOLLEDO, 2009; ALBINO, 2005).

Em países onde os programas de erradicação conseguiram um controle eficiente, sua ocorrência é rara. Caracterizada por um curso agudo em aves jovens e crônica em adultos, apresentando morbidade elevada em ambos os casos. A mortalidade geralmente está restrita entre duas e três semanas de idade (REVOLLEDO, 2009).

Pode ser transmitida tanto horizontal como vertical, porém as aves infectadas são a fonte de infecção mais importante, pois contaminam o ambiente, as demais aves e seus ovos, transmitindo para sua progênie (STERZO et al., 2008).

Após penetrar no organismo hospedeiro, a bactéria é fagocitada por macrófagos, que servem de local de multiplicação e de disseminação da bactéria aos órgãos do sistema reticuloendotelial e outros órgãos, resultando em uma doença septicêmica (REVOLLEDO, 2009).

Ainda segundo Revolledo (2009), frequentemente a pulrose acomete aves jovens e a primeira indicação da doença é um alto número de embriões mortos dentro do ovo ou após o nascimento. As aves afetadas mostram sinais variáveis e não específicos, incluindo depressão, dificuldade respiratória, anorexia, diminuição na produção e na eclodibilidade dos ovos, excrementos brancos que se aderem ao redor da cloaca e nos perus essa diarreia pode ser verde ou verde-amarelada (AIELLO, 2001; REVOLLEDO, 2009).

O diagnóstico definitivo requer isolamento e identificação do agente. Como diagnósticos sorológicos empregam-se a SAR, que é utilizada com sucesso como método de triagem, a soroaglutinação lenta em tubos e a microaglutinação (BERCHIERI JÚNIOR; MACARI, 2000).

O diagnóstico diferencial inclui as outras salmonelas, *Aspergillus* e outros fungos, que provocam lesões pulmonares; *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus aureus* e *Pasteurella multocida* (doenças articulares), e outras infecções bacterianas, como colibacilose, estafilococose ou estreptococose, observados através de lesões nos ovários (REVOLLEDO, 2009).

O tratamento com antibiótico não é eficiente, as aves tornam-se portadoras sãs. (AIELLO, 2001). Os programas de controle e erradicação das salmoneloses baseiam-se na identificação e descarte de aves e até mesmo de lotes soropositivos, além de medidas de

biossegurança com manejo apropriado de acordo com o PNSA, Instrução Normativa/SDA nº 3 de 09 de janeiro de 2002 (IN 3) (BRASIL, 2002).

2.2.3 Tifo aviário

A primeira descrição do tifo aviário ocorreu na Inglaterra, por Klein em 1889. A sua denominação se deve a febre tifóide em humanos e para diferenciá-la da cólera aviária (BERCHIERI JUNIOR; OLIVEIRA, 2009).

Tem como agente etiológico a *Salmonella Gallinarum* (SG), causando uma septicemia aguda e crônica com alta morbidade e mortalidade variável. Ataca principalmente galinhas e perus criados em alta densidade (ALBINO, 2005). Pode produzir lesões semelhantes as da pulorose em pintos e em perus jovens. Nas regiões endêmicas ocorre morte súbita em aves adultas, resultado da septicemia (QUINN et al., 2005).

A epidemiologia do tifo aviário tem sido diretamente relacionada com a da pulorose. Essas duas salmonelas são muito parecidas quanto as suas características antigênicas e bioquímicas, sendo passível de confusão no diagnóstico bacteriológico. No entanto, quanto à relação parasito-hospedeiro, a SG pode ser encontrada nas aves por um breve período, desde a infecção até a manifestação clínica, permanecendo na ave sobrevivente por poucos dias (BERCHIERI JUNIOR; OLIVEIRA, 2009).

A transmissão pode ocorrer pela via horizontal e vertical. A presença de animais mortos no ambiente desempenha importante papel na epidemiologia do tifo aviário (MENDES et al., 2004).

O diagnóstico é semelhante ao da pulorose, com base nos achados clínicos, anatomopatológicos e exames laboratoriais. O diagnóstico diferencial deve ser feito com relação às outras salmoneloses, com colibacilose, pasteurelose e micoplasmoses. O tratamento pode reduzir a mortalidade, mas não elimina o portador. E como já foi observado resistência, o uso de antibióticos deve ser precedido com antibiogramas (BERCHIERI JUNIOR; OLIVEIRA, 2009).

O controle e erradicação são baseados na vigilância sanitária, com a adoção de medidas de biosseguranças, associada com exames sorológicos e sacrifício compulsório para as aves infectadas por SP e SG (BRASIL, 2002).

2.2.4 Paratifo aviário

O paratifo aviário é provocado por mais de 1200 sorotipos (ALBINO, 2005), sendo os sorotipos Enteritidis e Typhimurium os principais responsáveis pela infecção (STERZO et al., 2008).

A presença de *Salmonella* spp. é mais frequentemente descrita em aves e produtos de origem aviária. Diante desse quadro, não há surpresa ao relacionar a ingestão desses alimentos com surtos de toxinfecção alimentar em humanos, caracterizando uma antropozoonose, representando importante influência na saúde pública (ANDREATTI FILHO, 2009).

A distribuição e a transmissão do paratifo estão relacionadas com o grande número de possíveis hospedeiros, como humanos, animais domésticos e silvestres. Tornando-a amplamente distribuída em todo o mundo. Existem múltiplas formas de contaminação, desde antes de nascer, através da transmissão transovariana, até o preparo de alimentos. Porém, a principal forma é a horizontal (ALBINO, 2005; ANDREATTI FILHO, 2009).

É frequentemente subclínica em aves de postura (QUINN et al., 2005), afetando a eclodibilidade e o desempenho das mesmas (ALBINO, 2005). E em aves jovens a sintomatologia poderá ser semelhante à pulorose e ao tifo aviário. Observa-se apatia, anorexia, penas arrepiadas e diarreia profusa seguida de empastamento da cloaca. Cegueira, conjuntivite e claudicação, também podem ser observadas (ANDREATTI FILHO, 2009). Pintos ou aves estressadas podem apresentar septicemia fatal, mas a mortalidade geralmente é rara em aves com mais de quatro semanas de vida (MENDES et al., 2004).

O histórico e os sinais clínicos são apenas indicativos de paratifo aviário. Testes sorológicos são utilizados na pesquisa de anticorpos em aves infectadas e o diagnóstico de positivo é confirmado por isolamento e identificação do sorovar de *Salmonella* envolvido. O teste de SAR para pulorose é capaz de detectar galinhas infectadas com *S. Enteritidis* porque pertencem ao mesmo sorogrupo (ANDREATTI FILHO, 2009).

Segundo Andreatti Filho (2009), a distribuição e as formas de contaminação torna o controle dessa enfermidade extremamente difícil e oneroso, e como a bactéria pode adentrar nos plantéis e se perpetuar, a erradicação dos sorovares paratifóides nas criações avícolas ainda é impossível.

A medicação preventiva ou terapêutica de aves tem sido um dos processos mais utilizados no controle da enfermidade, principalmente quando causada pelo sorovar Enteritidis (ANDREATTI FILHO, 2009). Vale salientar que o uso de drogas reduz a mortalidade e o número de microrganismos, mas não elimina a infecção e as aves permanecem portadoras. A enrofloxacina e as demais quinolonas de terceira geração é o tratamento mais utilizado (MENDES et al, 2004).

O uso da vacina viva está liberado pelo MAPA para aves de postura comercial. Para matrizes de corte só há liberação para uso de vacina morta. Segundo a IN 3 de 2002, fica proibido o uso de vacinas de qualquer natureza contra as salmoneloses em plantéis de aves de estabelecimentos com controle permanente do PNSA. É importante salientar que somente a vacina tem eficácia limitada no controle da salmonela, tendo a mesma que vir como parte de um conjunto de medidas, principalmente as de biossegurança (BACK, 2008; BRASIL, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais das Atividades

A coleta das amostras foi desenvolvida em propriedades rurais que criam aves de “fundo de quintal” no município de Patos, Paraíba. Os exames foram realizados no Laboratório de Vacinas e Diagnóstico (LAVADI), Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos – PB.

3.2 Amostragem

Para determinar o número de aves domésticas que participaram da pesquisa utilizou-se a fórmula para amostras simples aleatórias, segundo Thrusfield (2004), em que foram considerados os seguintes parâmetros: prevalência esperada, erro absoluto e nível de confiança:

$$n = \frac{Z^2 \times p (1 - p)}{d^2}$$

em que:

$Z = 1,96$ (nível de confiança de 95%);

p = prevalência esperada de 50% (maximização de amostra);

d = erro absoluto de 8%.

O número mínimo de aves estimado para ser utilizado foi de 150, logo foi coletado sangue de 153 aves criadas no sistema extensivo, semi- intensivo e intensivo de criação, de distintas espécies, de ambos os sexos, de variadas idades (com mais de dois meses de idade), independentemente da presença de sinais clínicos, selecionadas aleatoriamente em 11 propriedades do município de Patos, Estado da Paraíba.

3.3 Propriedades e Animais

O município de Patos está localizado na microrregião de mesmo nome, mesorregião do Sertão Paraibano. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE (2013), a sede do município fica distante cerca de 310 km da capital, João Pessoa. Patos está localizada no centro do estado, determinada pelos paralelos 7° 01' 28" de Latitude Sul e 37° 16' 48" Longitude Oeste.

As coletas foram distribuídas em quatro localidades diferentes no município de Patos: o Distrito de Santa Gertrudes, a noroeste, com as propriedades **A, B, C, D, E e F**; ao sul, o Bairro do Jatobá, propriedade **G**; ao norte, o Sítio Mucambo de Baixo, com as propriedades **H e I**; e a oeste, o Bairro Maternidade, propriedades **J e K** (Figura 1).

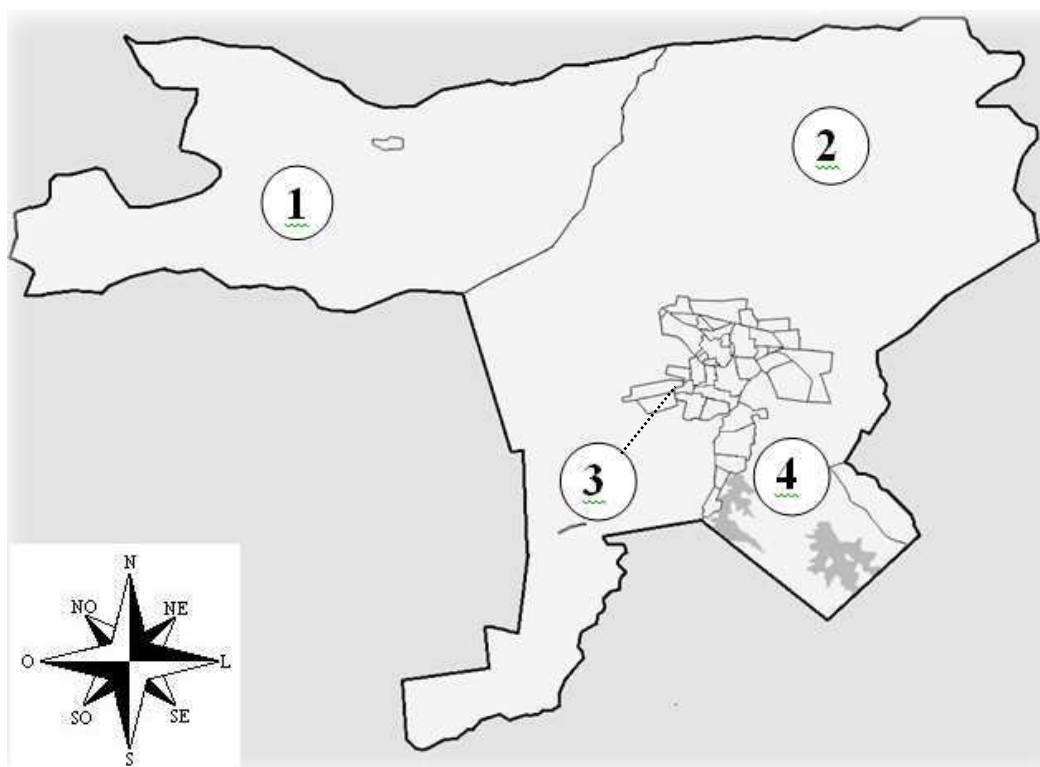


Figura 1. Mapa do município de Patos-PB e a localização das regiões onde houve coletas. 1- Distrito de Santa Gertrudes; 2- Sítio Mucambo de Baixo; 3- Bairro Maternidade; 4- Bairro Jatobá.

A escolha das propriedades foi realizada por amostragem não probabilística por conveniência e concordância do proprietário. O critério de escolha foi a existência de criação informal de aves, conhecidas como aves de “fundo de quintal”.

Foram coletadas amostras de 129 galináceos, dois guinés, dois patos, oito gansos e 12 perus, totalizando 153 aves provenientes de 11 propriedades com criação intensiva, semi-intensiva ou extensiva. Sendo que em quatro dessas propriedades havia duas criações distintas, como foi o caso das propriedades B, G, I, e K. O total de animais coletados por propriedades e por espécie está descrito no apêndice I.

3.4 Coleta das Amostras

A coleta de sangue foi realizada através da punção da veia umeral (asa) utilizando seringas estéreis e descartáveis de três mililitros e agulhas 21 x 0,7 mm, também estéreis e descartáveis (Figuras 2 e 3). O excesso de penas foi retirado, quando necessário, e em seguida procedido a assepsia com álcool iodado. O sangue foi transferido para tubos de vidro estéreis, mantido em repouso para dessoração e encaminhado ao LAVADI.

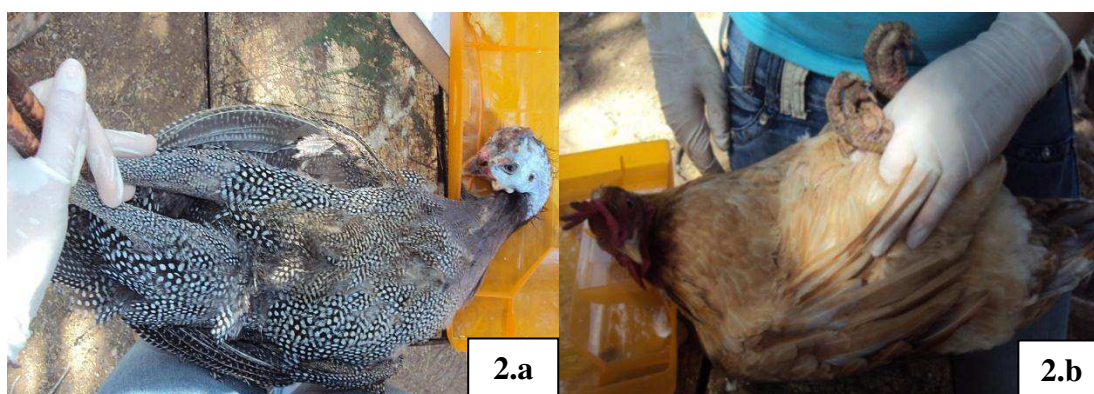


Figura 2. Contenção das aves. 2.a- Guiné; 2.b- Galinha.



Figura 3. Coleta de sangue por meio da punção da veia umeral em ave. 3.a- Veia umeral; 3.b- Coleta de sangue por punção da veia umeral.

3.5 Questionário

Para o estudo de fatores de risco associados à disseminação destes microrganismos, foi aplicado um questionário epidemiológico nas propriedades onde as coletas foram realizadas (Apêndice II).

Coletou-se informações sobre a presença de doenças, utilização de medicamentos e vacinas, número de animais na propriedade, origem das aves, finalidade da criação, manejo sanitário, local de aquisição de ração e a presença de outras espécies animais na propriedade.

3.6 Exames Laboratoriais

No LAVADI realizou-se a centrifugação do sangue coletado para separação do soro que posteriormente foi armazenado em microtubos de 1,5 mL. Realizou-se a SAR, como teste de triagem para pesquisa de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e *Salmonella Pulum*. Posteriormente os soros foram armazenados à temperatura de -20°C até a realização do ELISA- indireto, como confirmatório para *Mycoplasma* sp.

O SAR foi realizado conforme recomendações do PNSA (BRASIL, 2002). Antes do teste, os soros foram submetidos a 56°C por 30 minutos em banho-maria para inativação do complemento. Para a prova de SAR foram utilizados antígenos comerciais corados (Antígeno MS, MG e PUL), obtidos junto a laboratório privado¹ licenciado junto ao Ministério da Agricultura sob nº 9646/ 2011 em 20 de dezembro de 2011. Quantidades iguais de soro e antígeno (30µL) foram homogeneizadas em placas de vidro com auxílio de bastão durante dois minutos, ao final do qual se efetuou a leitura. O soro foi considerado reagente quando houve a formação de grumos de qualquer intensidade. Os soros reagentes para SP foram diluídos em solução salina tamponada na diluição de 1:10, a fim de diminuir as reações inespecíficas, conforme preconizado para SAR, e somente os soros que reagiram nessa diluição com a formação de grumos (aglutininas) foram considerados positivos (Apêndice III).

Como preconizado pelo MAPA (BRASIL, 1994), para a confirmação da presença de anticorpos contra MG e MS foi utilizado o ELISA-indireto com kit de teste Flock Chek Idexx® (Apêndice IV).

O cálculo do ponto de corte do ELISA, da média geométrica dos títulos (GMT) e as demais variáveis estatísticas (coeficiente de variação (CV), desvio padrão (DP) e os valores máximos e mínimos) foram realizados pelo software xCheck versão 3.3 da Idexx®.

3.7 Estatística

Os dados foram tabulados e analisados com auxílio do programa BioEstat 5.0, através do teste de qui-quadrado, com níveis de significância de 1% e 5%.

¹Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda S/A

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na município de Patos, Estado da Paraíba, considerando-se todas as propriedades amostradas, havia elevada proporção de aves reagentes aos microrganismos estudados pela SAR e pelo o ELISA- indireto, como demonstrado na Tabela 1.

Entre as 153 aves de “fundo de quintal” examinadas, 75,17% (112/153) apresentaram sorologia positiva para SP na SAR com o soro bruto (SB), enquanto que 96,42% dessas (108/111) reagiram na diluição de 1:10. Isso não corrobora com os achados de Nunes (2008), que encontrou uma soroprevalência para SP de 28,2% em galinhas de dez propriedades no Município de São José do Egito, de Pessoa et al. (2006), que observaram soropositividade para este agente em 11,4% das aves analisadas (12/105), e de Buchala et al. (2006), que encontraram 16,5% de aves sororreagentes. Todos realizaram os estudos com aves de “fundo de quintal”, utilizaram a SAR e apenas Buchala e colaboradores (2006) realizaram a soroaaglutinação lenta como teste confirmatório.

Tabela 1. Soroaaglutinação Rápida (SAR) em placa e Ensaio imunoenzimático (ELISA-indireto) para diagnóstico de *Salmonella Pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves de "fundo de quintal" criadas no município de Patos, Paraíba.

Agentes/ Exames	Nº de Amostras	Positivo (%)	Negativo (%)
<i>M. gallisepticum</i>			
SAR	153	128 (83,66%)	25 (16,34%)
ELISA	153	56 (36,60%)	97 (63,40%)
<i>M. synoviae</i>			
SAR	153	121 (79,08%)	32 (20,92%)
ELISA	153	101 (66,01%)	52 (33,99%)
<i>S. Pullorum</i>			
SAR			
Soro Bruto	149	112 (75,17%)	37 (24,83%)
1:10	112	108 (96,42%)	4 (3,58%)

Para MG, 83,66% (128/153) das aves reagiram ao antígeno na SAR, enquanto que apenas 36,60% (56/ 153) apresentaram anticorpos no ELISA. Para MS, 79,08% (121/153) das aves foram sororreagentes na SAR e 66,01% (101/153) no ELISA. Isto vai ao encontro com os achados de Correzola et al. (2012) utilizando a SAR para MG, que encontraram 88,20% das aves de postura reagentes, mas não corrobora com os achados do mesmo

estudo pelo ELISA para MG, que encontrou 89,80% positivas. A grande quantidade de aves sororreagentes no ELISA neste estudo está associada à disseminação de cepas vacinais utilizadas em criatórios de aves de postura. Buchala et al. (2006) observaram 30,30% de aves soropositivas para MG, e 40,60% para MS pela SAR. E no estudo realizado por Nunes (2008), todas as aves foram sororreagentes para MG e MS na SAR.

Essas diferenças entre os resultados da SAR e do ELISA podem ser explicadas por reações cruzadas que ocorrem na SAR, principalmente com *M. meleagridis*, *M. iowae* e/ou *M. imitans*, ou com outras bactérias, além da relação antigênica entre MG e MS (METTIFOGO; BUIM, 2009). Ocorrem também reações cruzadas na SAR entre *Salmonella* e *Mycoplasma*, como relatado por Custódio (1998).

A criação de aves de “fundo de quintal” desenvolve produtos que são fontes de proteína para as pessoas de baixa renda e para as que preferem uma carne mais saborosa e ovos com tonalidade de gema bem avermelhado, isto é, alimentos mais naturais. Além da sustentabilidade na venda destes produtos ao mercado regional. Mas, em contra partida, estas aves, no geral, são criadas com manejo sanitário deficitário, sem vacinação, sem alimentação adequada e misturando-se diferentes espécies; expondo-as a inúmeros agentes bacterianos o que pode ocasionar reações cruzadas no teste sorológico levando a resultados falso-positivos.

Segundo Ahmad e colaboradores (1988), as reações falso-positivas também podem ser atribuídas à presença de globulinas ou outro componente do soro usado na cultura de micoplasma para produção do antígeno para o teste SAR. Sabendo das diferenças significativas na sensibilidade e na especificidade destes antígenos (ROSALES, 1999), na variabilidade entre as partidas do mesmo fabricante e entre os laboratórios executores de diagnóstico (MIRANDA DOS SANTOS et al., 2007), utilizou-se antígenos do mesmo fabricante e da mesma partida para a SAR em todos os soros testados, a fim de diminuir a possibilidade de resultados divergentes. Também foi excluída a possibilidade de reações falso-positivas por soros contaminados (METTIFOGO; BUIM, 2009), porque foram utilizadas seringas e agulhas estéreis e individuais para cada ave.

Foi importante avaliar a resposta das aves considerando conjuntamente a SAR (triagem) e o ELISA- indireto (confirmatório), pois a SAR detecta IgM de forma precoce (7 a 10 dias pós-infecção) e indica soroconversão, enquanto que o ELISA detecta IgG de forma mais tardia (15 a 21 dias) indicando infecção crônica (CERDÁ, 2009; BUTCHER, 2009; NASCIMENTO, 2000).

Como demonstrado nas tabelas 2 e 3, das 153 amostras analisadas, 50 (32,68%) e 78 (50,98%) apresentaram sororreatividade simultaneamente na SAR e no ELISA para MG e MS, respectivamente, o que indica que esses animais estavam em estágio agudo da infecção, pois não eram vacinadas contra micoplasmose. Porém, apenas três aves apresentavam sinais respiratórios, dois tinham secreção traqueal e uma, espessamento da glote. Uma das explicações é a infecção por cepas de campo de baixa patogenicidade, que colonizam as vias aéreas das aves e competem com as cepas mais patogênicas na ligação com os receptores do epitélio traqueal (METTIFOGO; BUIM, 2009). Correzola et al. (2012) observaram que 84,30% (193/229) das aves não vacinadas apresentaram sororreatividade simultaneamente à SAR e ao ELISA para MG.

Tabela 2. Sororreatividade das aves simultaneamente à Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e ao Ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) no município de Patos, Paraíba.

ELISA	SAR		Total
	Reagente (%)	Não Reagente (%)	
Positivo	50 (32,68%)	6 (3,92%) - FN	56
Negativo	78 (50,98%) - FP	19 (12,42%)	97
Total	128	25	153

FN- Falso- negativo; FP- Falso- positivo.

Tabela 3. Sororreatividade das aves simultaneamente à Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e ao Ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico de *Mycoplasma synoviae* (MS) no município de Patos, Paraíba.

ELISA	SAR		Total
	Reagente (%)	Não Reagente (%)	
Positivo	78 (50,98%)	23 (15,03%) - FN	101
Negativo	43 (28,11%) - FP	9 (5,88%)	52
Total	121	32	153

FN- Falso- negativo; FP- Falso- positivo.

Todas as propriedades avaliadas apresentaram animais sororreagentes ao MG, MS e SP na SAR. Para MS no ELISA todas as propriedades apresentaram animais positivos (Tabela 4, 5 e 6). Dez das 11 propriedades estudadas (90,91%) apresentaram anticorpos anti- *M. gallisepticum* em pelo menos uma ave, apenas as duas criações da propriedade I não apresentaram sororreagentes, como está demonstrado na tabela 5. Isto pode estar associado às boas condições de criação e por ser a única propriedade a fazer uso de

antibiótico de forma preventiva. Buchala et al. (2006), no Estado de São Paulo, relataram a ocorrência de MG em 73% (11/15) dos criatórios de aves de “fundo de quintal”, com pelo menos uma ave sororreagente à prova de SAR e Nunes (2008) encontrou em 100% das propriedades aves reagentes para MG e MS e oito das 10 propriedades estudadas apresentaram anticorpos anti- *S. Pullorum* pela SAR.

As propriedades que participaram desta pesquisa tinham características distintas mesmo as que possuíam o mesmo tipo de criação.

As propriedades B₁, C e F possuíam criação intensiva. A criação B₁ e F eram compostas apenas de galináceos para corte, com aproximadamente dois meses de idade, criadas em galinheiro suspenso, de concreto, com um lado ou mais lados fechados por tela galvanizada, com bebedouros e comedouros suspensos. Na criação C, as aves tinham idades variadas e eram presas em galinheiro de terra batida, cercado por tela galvanizada.

As criações B₂, I₁ e I₂ eram do tipo semi-intensiva. A criação na propriedade B₂ era composta por galinhas de postura com idades variadas. As aves ficavam em um cercado de terra batida e possuíam um galinheiro de madeira de meio metro de altura, onde as galinhas chocavam. A comida e a água eram colocadas em vasilhas.

Na propriedade I as criações (I₁ e I₂) eram de corte, os galináceos estavam entre um e três meses. Viviam em um cercado de grama, arborizado e com um galinheiro de concreto, com duas aberturas para que as aves tivessem acesso ao cercado. A comida era ração e xerém servidos a vontade, em comedouros suspensos.

As criações A, D, E, G₁, G₂, H, J, K₁ e K₂ eram do tipo extensiva. Quase todas as propriedades de criação extensiva criavam mais de uma espécie de ave, com exceção da A, que só tinha galináceos. As aves eram criadas soltas pelo terreno que em sua maior parte era de terra batida onde recebiam comida no chão e água em recipiente próprio.

A propriedade J não tinha saneamento básico e as aves tinham acesso ao esgoto, sendo este a sua água de beber. Na propriedade K o terreno era parcialmente coberto por gramado onde as aves podiam ciscar. Os animais da K₂ estavam presos em um galinheiro, pois iam para o abate em breve, mas toda a sua criação foi de modo extensivo.

A frequência de criatórios com aves sororreagentes para o antígeno MS foi estatisticamente superior à frequência de criatórios com aves sororreagentes para o antígeno MG, quando avaliados pelo ELISA, que é um teste confirmatório.

Quando analisadas as amostras levando em consideração o tipo de criação, observou-se que não houve diferença estatística entre a ocorrência de salmonelose e

micoplasmose em aves criadas soltas, presas em galinheiro ou em sistema semi-intensivo, indicando que o manejo dessas aves não foi importante para a disseminação dos microrganismos. No estudo realizado por Pessoa et al. (2006), também não houve diferença significativa na criação solta e presa em galinheiro para salmonelose. Já Miranda dos Santos et al. (2007) concluíram que os resultados do SAR variaram de acordo com o tipo de criação para micoplasmose.

Observou-se grande adensamento populacional nas criações de aves, com idades e espécies variadas, além da existência de outros animais, o que pode ter contribuído para a difusão dos microrganismos e a elevada sororreatividade total na SAR e no ELISA.

Nascimento (2000) aponta que a multiplicidade de lotes de diferentes idades numa mesma propriedade atua como agente facilitador do aparecimento de doenças e infecções intercorrentes e da disseminação de patógenos entre as aves do mesmo lote e entre lotes.

A avaliação da presença de fontes de infecção pela detecção de anticorpos representa um rápido e prático instrumento de importância epidemiológica e posteriormente para a prevenção e o controle das enfermidades. A reação positiva não indica o número de aves doentes, mas revela o contato das aves com os respectivos agentes, demonstrando a presença ou a circulação de agentes etiológicos na população (METTIFOGO; BUIM, 2009; REVOLLEDO, 2009).

Tabela 4. Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas presas em galinheiros no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Criação/ Propriedade	Nº de aves examinadas	Resultados Positivos					
		MG		MS		PUL	
		SAR	ELISA	SAR	ELISA	SAR (SB)	SAR (1:10)
Intensiva							
B₁	8	8 (100%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)	6 (75%)	6/7 (85,7%)	6/6 (100%)
C	8	8 (100%)	8 (100%)	7 (87,5%)	5 (62,5%)	7 (87,5%)	7/7 (100%)
F	15	7 (46,67%)	2 (13,33%)	8 (53,33%)	10 (67,67%)	13 (86,67%)	13/13 (100%)
Total	31	23 (74,19%)	11 (35,48%)	22 (70,97%)	21 (67,74%)	26/30 (90%)	26/26 (100%)

SB- Soro Bruto.

Tabela 5. Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas em regime semi-intensivo no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Criação/ Propriedade	Nº de aves examinadas	Resultados Positivos					
		MG		MS		PUL	
		SAR	ELISA	SAR	ELISA	SAR (SB)	SAR (1:10)
B₂	7	7 (100%)	5 (71%)	7 (100%)	6 (86%)	2/4 (50%)	2/2 (100%)
I₁	12	11 (91,67%)	0	11 (91,67%)	7 (58,33%)	11 (91,67%)	11/11 (100%)
I₂	12	11 (91,67%)	0	12 (100%)	3 (25%)	10 (83,33%)	9/10 (90%)
Total	31	29 (93,55%)	5 (16,13%)	30 (96,77%)	16 (51,61%)	23/28 (82,14%)	22/23 (95,65%)

SB- Soro Bruto

Tabela 6. Ocorrência de aves de “fundo de quintal” sororreagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *Salmonella Pullorum* (SP) em propriedades onde as aves são criadas soltas no Município de Patos, PB, utilizando a Soroaglutinação rápida (SAR) em placa e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA-indireto).

Criação/ Propriedade	Nº de aves examinadas	Resultados Positivos					
		MG		MS		PUL	
		SAR	ELISA	SAR	ELISA	SAR (SB)	SAR (1:10)
<u>Extensiva</u>							
A	15	15 (100%)	9 (60%)	15 (100%)	9 (60%)	14 (93,33%)	14/14 (100%)
D	4	4 (100%)	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)	2 (50%)	2/2 (100%)
E	3	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3/3 (100%)
G₁	15	10 (66,67%)	7 (46,67%)	13 (86,67%)	10 (66,67%)	10 (66,67%)	9/10 (90%)
G₂	17	10 (58,82%)	9 (52,94%)	11 (64,71%)	12 (70,59%)	9 (52,94%)	8/9 (88,89%)
H	6	5 (83,33%)	2 (33,33%)	3 (50%)	6 (100%)	3 (50%)	3/3 (100%)
J	11	11 (100%)	3 (27,27%)	8 (72,72%)	8 (72,72%)	9 (81,81%)	8/9 (88,89%)
K₁	10	8 (80%)	3 (30%)	6 (60%)	7 (70%)	6 (60%)	6/6 (100%)
K₂	10	10 (100%)	1 (10%)	7 (70%)	6 (60%)	7 (70%)	7/7 (100%)
Total	91	76 (83,51%)	40 (43,96%)	69 (75,82%)	64 (70,33%)	63 (69,23%)	60/63 (95,24%)

SB- Soro Bruto.

5. CONCLUSÃO

A alta frequência de aves sororreagentes aos antígenos testados, associada às formas de transmissão dos microrganismos do *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *Salmonella Pullorum*, permite-nos concluir que tais agentes encontram-se amplamente distribuídos na natureza, infectando e disseminando-se nas criações de aves de "fundo de quintal".

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I. et al. Sensitivity and specificity of *Mycoplasma gallisepticum* agglutination antigens prepared from medium with liposomes substituting for serum. **Avian Diseases**, v. 32, n. 3, p. 519-526, 1988.

AIELLO, S. E. **Manual Merck de veterinária**. 8 ed. São Paulo: ROCA, 2001. p. 1598-1601; 1614-1615.

ALBINO, L. F. T. et al. **Criação de frango e galinha caipira: avicultura alternativa**. 2 ed. Viçosa – MG: Aprenda Fácil; 2005, 208p.

ANDREATTI FILHO, R. L. Paratifo aviário. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 3, p. 18-33.

ANUALPEC 2011: **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011.

BACK, A. **Salmonella: a Infecção, Monitoramento e Controle em Aves de Corte**. 2008. Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/artigos/post/salmonella-a-infeccao-monitoramento-e-controle-em-aves-de-corte_4574>. Acessado em: 05 dez. 2012.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. São Paulo: Facta, 2000. 490p.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Tifo Aviário. In: In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 3, p. 18-33.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. – Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009.

_____. **Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* e livres ou controladas para *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium***. Atos legais. Instrução Normativa nº 03. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 09 de janeiro de 2002. Poder Executivo.

_____. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Atos legais. Portaria 193. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília – DF, 19 set 1994.

BUCHALA, F. G. et al. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella pullorum* em aves de “fundo de quintal” do estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.1, p.1-5, jan./mar., 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_1/buchala.PDF>. Acesso em: 20 nov. 2012.

BUTCHER, G. D. **Factors to consider in serologic testing for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae***. VM126 series. Veterinary Medicine Large Animal Clinical Sciences Department, Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. April 2009. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/VM/VM09300.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2013

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Monitoria sorológica da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.1, p.23-26, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_1/cardoso1.PDF>. Acesso em: 17 mar. 2012.

CERDÁ, R. O. *Mycoplasma synoviae*. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 9.2, p. 101-107

CORREZOLA, L. M. et al. Reações sorológicas contra *Mycoplasma gallisepticum* em aves de postura de granjas comerciais no estado de São Paulo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.28, n.1, 041-047, 2012. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/391/416>>. Acesso em: 22 out. 2012.

DORN, P. **Manual de patologia aviária**. Tradução José Romero Muñoz de Arenillas. Zaragoza: Acribia, 1973. p. 85-98.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182p.

FIorentin, L. **Recentes avanços no controle das micoplasmoses**. II Simpósio de Sanidade Avícola. Santa Maria, 2000. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=374>. Acesso em: 13 out. 2012.

GAMA, N. M. S. Q. et al. Doenças respiratórias. In: II CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM AVICULTURA PARA POSTURA COMERCIAL, 2005. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 2005. p. 43-49.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 31, p. 153- 162.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Patos- PB – Dados básicos. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=251080#>>. Acesso em: 10 jan. 2013

MENDES, A. A. et al. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004. p. 233-236.

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 9.1, p. 86-100.

METTIFOGO, E.; FERREIRA, A. J. P. Micoplasmose aviária. In: FILHO, R. L. A. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Editora Roca, 2007. p. 147-151.

MIRANDA DOS SANTOS, B. Confiabilidade de um teste de triagem para Micoplasmose aviária. **Vet. Zoo tec.** 1(1): 18-23, 2007. Disponível em: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/Revista1_3.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2012.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2000. p.217-224.

NOCARD, E; ROUX, E.R. Le microbe de la peripneumonie. **Ann. Inst. Pasteur Paris**, v. 12, p. 240–262. 1898. Disponível em: <<http://www.biodiversitylibrary.org/pdf3/005358100022266.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

NUNES, A. G. de B. **Anticorpos Anti-Salmonella pullorum, Anti-Mycoplasma gallisepticum e Anti-Mycoplasma synoviae, em Galinhas (Gallus gallus domesticus) de Fundo de Quintal de Propriedades Rurais do Município de São José do Egito, Estado de Pernambuco**. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Patos – PB: CSTR/UFCG, 2008. Disponível em: <http://www.cstr.ufcg.edu.br/mv_downloads/monografias/mono_aecio.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PESSOA, S. A. R. et al. Aves “caipiras” soropositivas para *Salmonella pullorum* e *S. gallinarum* no município de Suzano. *Biológico*, São Paulo, v.68, Suplemento, p.96-98, 2006. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/suplementos/v68_supl/p096-098.pdf>. Acesso em: 14 out. 2012.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 33, p. 191-199.

REVOLLEDO, L. Pulrose. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 11, p. 124-128.

ROSALES, A. G. Monitoria sorológica em aves. In: Conferência APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas. 1999. **Anais...** Campinas- SP: APINCO, 1999. v. 1, p. 46- 52.

ROSSINI, L. I.; MONTEIRO, M. C. G. B. Problemas respiratórios em frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas-SP: Facta, 2004. Cap. 14, 356p.

SANTOS, B. M. et al. **Cadernos Didáticos: Principais Doenças Bacterianas das Aves**. Viçosa: UFV, 1995. p. 9-24.

STERZO, E. V.; VARZONE, J. R. M.; FERRARI, R. Salmoneloses Aviárias. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 7, n. 2, p. 129-138, 2008. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=26012841011>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. Tradução Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 223-239.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose – conceitos gerais. In: REVOLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri-SP: Manole, 2009. Cap. 9, p. 82-85.

UBABEF, **União Brasileira de Avicultura**, relatório anual 2012. São Paulo. 2012. p. 19 (Boletim Técnico). Disponível em: <<http://file.aviculturaindustrial.com.br/Material/Relatorio/2012/relatorioanual2012.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2013.

APÊNDICE I

TOTAL DE AVES COLETADO POR PROPRIEDADES E POR ESPÉCIE E O
NÚMERO ESTIMADO DE AVES EM CADA PROPRIEDADE

Propriedade/ Espécie	Galináceos (Coletados/ Total)	Gansos (Coletados/ Total)	Pato (Coletados/ Total)	Peru (Coletados/ Total)	Guiné (Coletados/ Total)	Total
A	15/45					15/45
B₁ e B₂	15/300					15/300
C	8/200					8/200
D	3/6		1/5			4/11
E	3/12					3/12
F	15/59					15/59
G₁ e G₂	18/100	3/10		11/30		32/140
H	3/10	3/3				6/13
I₁ e I₂	24/500					24/500
J	7/20		1/5	1/1	2/8	11/34
K₁ e K₂	18/40	2/15				20/55
Total	129/1307	8/28	2/10	12/31	2/8	153/1384

APÊNDICE II**QUESTIONÁRIO**

“Salmonelose e micoplasmose em aves domésticas criadas em fundo de quintal no município de Patos - PB.”

PROPRIETÁRIO: _____ DATA ___/___/___

ENDEREÇO: _____

ANIMAIS (Coletado/Total): GALINHA (G) ___/___ PERU (P) ___/___

GANSO (Gs) ___/___ PATO (Pt) ___/___ GINÉ (Gn) ___/___

OUTROS: _____

ORIGEM: _____

DESTINO: _____

QUEM CUIDA: _____

MEDICAMENTOS E VACINAS (QUAL/FINALIDADE): _____

RELATOS DE DOENÇAS ANTERIORES:

AVES: _____

SINTOMAS: _____

TRATAMENTO: _____

DESTINO: _____

MANEJO SANITÁRIO: _____

ALIMENTAÇÃO (Capim verde): _____

LOCAL DE AQUISIÇÃO DE RAÇÃO: _____

APÊNDICE III

TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA (SAR) EM PLACA (BRASIL, 2002).

MATERIAL:

- Placa de vidro para reação de soroaglutinação
- Bastão de vidro
- Pipeta monocal de 5-50 μ L
- Ponteira universal
- Cronômetro

PROCEDIMENTO:

- Retirar o antígeno, o soro a ser testado e os soros de controle positivo e negativo do refrigerador e mantê-los à temperatura ambiente por 30 minutos; não acelerar o processo de aquecimento.
- Inativar o soro a ser testado em banho-maria a 56°C por 30 minutos.
- Pipetar uma gota de 30 μ L do soro a ser testado, bem como os soros de controle positivo e negativo e colocar sobre a placa de vidro.
- Agitar o frasco de antígeno, pipetar e colocar 30 μ L ao lado de cada amostra de soro.
- Homogeneizar as gotas de soro e do antígeno com o bastão formando um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro.
- Girar a placa suavemente e aguardar. No fim do primeiro minuto girar novamente a placa, observar e anotar o resultado em dois minutos.

INTERPRETAÇÃO DO TESTE:

As reações positivas são visíveis dentro de um intervalo de dois minutos e se caracterizam pela presença de grumos. O tamanho desses grumos é variável na dependência da concentração de anticorpos no soro. Uma reação só pode ser considerada negativa depois de um período de observação de dois minutos.

OBS: O teste deve ser realizado entre 20°C e 25°C. Em temperaturas superiores podem ocorrer falsas reações positivas de auto-aglutinação. A diluição das amostras de soro pode indicar se a reação deve ser considerada falsa positiva ou não. Reações realmente positivas aparecem em diluições 1:10. Esta prova deve ser realizada com soro fresco, não sendo indicado congelá-los, pois favorecerá reações inespecíficas.

APÊNDICE IV

KIT DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycoplasma* sp.

PREPARO DAS AMOSTRAS:

Diluir amostras em proporção 1:500 com Diluente de Amostra antes de ser ensaiada (por exemplo, diluindo-se 1µL de amostra com 500 µL de Diluente de Amostra). NOTA: NÃO DILUIR CONTROLES. Certifique-se de trocar ponteiros para cada amostra. Amostras devem ser totalmente misturadas antes de ser distribuídas nas placas revestidas.

PROCEDIMENTO DE TESTE:

Reagentes devem ser deixados a alcançar a temperatura ambiente, então misturado através de inversão e movimentos circulares suaves.

1. Obter placa revestida de antígeno e registra a posição da amostra em uma folha de trabalho FlockChek.
2. Distribuir 100 µL de Controle Negativo NÃO DILUIDO nas cavidades A1 e A2.
3. Distribuir 100 µL de Controle Positivo NÃO DILUIDO nas cavidades A3 e A4.
4. Distribuir 100 µL de amostra diluída nas cavidades apropriadas. Todas as amostras devem ser testadas em duplicatas.
5. Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente.
6. Lavar cada cavidade com aproximadamente 350 µL de água destilada ou deionizada 3-5 vezes.
7. Distribuir 100 µL de Conjugado HRPO: (cabra) Anti-Galinha/ (cabra) Anti-Peru em cavidade.
8. Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.
9. Repetir passo 6.
10. Distribuir 100 µL de substrato TMB em cada cavidade.
11. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente.
12. Distribuir 100 µL de Solução de Interrupção em cada cavidade para parar a reação.

13. Zerar leitor com ar.

14. Medir e registrar valores de absorbância a 650 nm, A(650).40

RESULTADOS:

Para o ensaio ser válido, a diferença entre a média do Controle Positivo e a média do Controle Negativo (PCx – NCx) deve ser maior que 0,075.

A absorbância média do Controle Negativo deve ser menor ou igual a 0,150. A presença ou ausência de anticorpo contra *M. gallisepticum* ou *M. synoviae* é determinada relacionando-se o valor A (650) do não conhecido com a media do Controle Positivo. O Controle Positivo é padronizado e representa níveis significantes de anticorpo contra *M. gallisepticum* ou *M. synoviae* em soro de galinha e peru. O nível relativo de anticorpo no não conhecido é determinado calculando-se o coeficiente de amostra por positivo (S/P). Titulações limites São calculadas usando a equação descrita na seção de cálculos.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS:

Amostras de soro com coeficiente S/P menores ou iguais a 0,5 devem ser consideradas negativas. Coeficientes maiores que 0,5 (titulações maiores que 1076) devem ser considerados positivos e indicam vacinação ou outra exposição à *M. gallisepticum* ou *M. synoviae*. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para imunidade com respeito à titulação de anticorpo baseado em correlação de Flock Chek: *M. gallisepticum* ou *M. synoviae* com metodologias atuais de teste de laboratório, e em históricos de respostas de anticorpo.

CÁLCULOS:

1. Média do Controle Negativo (NCx)

$$\frac{\text{Cavidade A1 A(650)} + \text{Cavidade A2 A(650)}}{2} = \text{NCx}$$

2. Calculo da média do Controle Positivo (PCx)

$$\frac{\text{Cavidade A3 A(650)} + \text{Cavidade A4 A(650)}}{2} = \text{PCx}$$

3. Calculo do coeficiente S/P

$$\frac{\text{Media da Amostra} - \text{NCx}}{\text{PCx} - \text{NCx}} = \text{S/P}$$

4. Titulação – Relaciona S/P em uma diluição 1:500 com uma titulação limite:

$$\text{Log10 Titulação} = 1,09 \times (\text{Log10 S/P}) + 3,36$$