



Confiabilidade de um teste de triagem para Micoplasmose aviária

ARTÍCULO ORIGINAL

Bernadete Miranda dos Santos¹, Sandra Yuliet Marín-Gómez¹,
Ana Carolina Barbosa de Paula¹

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, Brasil.

bmsantos@ufv.br

(Recibido: 14 noviembre, 2006; aprobado: 6 marzo, 2007)

RESUMO: Objetivando-se estudar o teste de triagem para Micoplasmose aviária, pela técnica de soroprecipitação rápida (SAR) em placas, foram analisadas 13.500 amostras de soros de galinhas de diferentes idades e diferentes tipos de criação. A confiabilidade da sensibilidade e da especificidade da prova foi medida pelo Índice de Youden. A probabilidade de diagnosticabilidade foi calculada pelo Teorema de Bayes. Para medir a interrelação de confiabilidade do teste de triagem para os diferentes tipos de criação e as diferentes idades das aves triadas, calculou-se o Kappa estatístico. Os frangos de corte com sete semanas de idade e os reprodutores com dezoito semanas de idade apresentaram as maiores frequências de reagentes à prova de SAR em placas para Micoplasmose (*Mycoplasma gallisepticum*). Nos reprodutores com dezoito semanas de idade, nos frangos de corte com três semanas de idade e nos reprodutores com oito semanas de idade obteve-se a maior probabilidade de diagnosticabilidade. Pelo Kappa estatístico concluiu-se que a confiabilidade para o teste de SAR para Micoplasmose (*Mycoplasma gallisepticum*) foi registrado para os frangos de corte com sete e com três semanas de idade. Estatisticamente, verificou-se diferenças significativas entre as variáveis tipo de criação e idade das aves tiradas, concluindo-se que as aves reagem diferentemente às provas de triagem pelo teste da SAR, de acordo com o tipo de criação e com a idade dos lotes selecionados.

Palavras chaves: antígeno-anticorpo, galinhas, *Mycoplasma gallisepticum*, soroprecipitação rápida

Evaluation of test for Mycoplasmosis of poultry

ABSTRACT: This study was conducted to evaluate the serological test for Mycoplasmosis in the flocks, the serum were analyzed by rapid serum agglutination test (SAR) in plates, 13.500 sera from chickens of different ages and different creation types were analyzed. The reliability of the sensibility and of the specificity of the proof it was measured by the Index of Youden. The diagnosticabilidade probability was calculated by the Theorem of Bayes. To measure the relation of reliability of the selection test for the different creation types and the different ages of the birds select, was made for statistical Kappa calculations. The cut chickens with seven weeks of age and the reproducers with eighteen weeks of age presented the largest frequencies of reagents to the proof of SAR in plates for Mycoplasmosis for *Mycoplasma gallisepticum*. In the reproducers with eighteen weeks of age, in the broilers with three weeks of age and in the reproducers with eight weeks of age was obtained the largest diagnostic probability. For statistical Kappa it was ended that the reliability for the test of SAR for Micoplasmose for *Mycoplasma gallisepticum* was registered for the broilers with seven and with three weeks of age. Statistically, was verified significant differences between the variant of production type and age of the birds select, being ended that the birds resist the selection proofs differently for the test of SAR, in agreement with the creation type and with the age of the lots select.

Key words: antigen-antibody, chickens, *Mycoplasma gallisepticum*, rapid serum agglutination test

Introdução

As micoplasmoses aviárias são enfermidades infecto-contagiosas de distribuição mundial, sendo que para os galináceos, o agente etiológico mais importante é o *Mycoplasma gallisepticum*, que está associado à doenças respiratórias crônicas e diminuição na produção de ovos (Nascimento, 2000; Kleven, 2003; Pereira & Silva, 2005). A doença afeta indistintamente frangos de corte, aves de postura comercial e reprodutores, causando altas perdas econômicas (Nascimento, 2000). Estas perdas ocorrem em função do decréscimo no ganho de peso e conversão alimentar, custos dos medicamentos para controle da enfermidade, queda na produção, qualidade e eclodibilidade de ovos, além de perdas por condenação de carcaças no abatedouro, devido principalmente a aerossaculite. O agente pode ser transmitido horizontalmente de ave para ave por meio de aerossóis, por contato direto com outras aves ou contato indireto de pessoas, animais ração, água e fômites, e verticalmente, pela via transovariana (Pereira & Silva, 2005), o que dificulta sua erradicação.

Considerando-se as dificuldades em se isolar micoplasmas aviários, a prova de soroaglutinação rápida (SAR) é usada como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de micoplasmoses (Cardoso et al., 2003; Mendonça et al., 2004), por ser um teste de grande sensibilidade, rápido, pouco dispendioso e simples, mas que se caracteriza pela baixa especificidade devido ao aparecimento de falsos positivos (Buchala, 2003). Esta baixa especificidade tem contribuído para falta de segurança no diagnóstico final das micoplasmoses, principalmente quando ela é empregada isoladamente (Mendonça et al., 2003). Harmad et al. (1988) relatam que as reações falso positivas podem ser atribuídas a presença de globulinas ou outro componente do soro no meio de crescimento usado na cultura de micoplasma para produção de antígeno para o teste SAR em placas ou pode estar relacionado ao aumento do uso de vacinas inativadas (Glisson et al., 1988). Existem ainda diferenças significativas na sensibilidade e na especificidade de antígenos (Rosales, 1999) e deve-se considerar que há

variabilidade entre as partidas dos antígenos e entre os procedimentos dos testes, além de haver possibilidade de reação positiva em soros contaminados.

O presente trabalho objetivou estudar a confiabilidade da técnica de SAR utilizada como teste de triagem para identificar populações de galinhas de diferentes tipos de criação e idades, positivas para micoplasmose, causada pelo *Mycoplasma gallisepticum*.

Material e Métodos

A pesquisa constitui-se de 13.500 amostras de soros de galinhas de diferentes tipos de criação e idades. As amostras estavam distribuídas da seguinte forma: 7.400 obtidas de frangos de corte (sendo 5.200 de aves com sete semanas de idade, 1.400 de aves com três semanas de idade e 800 de aves com duas semanas de idades); 5.800 obtidas de reprodutores (sendo 1.800 de aves com dezoito semanas de idade e 4.000 de aves com oito semanas de idade) e 800 amostras obtidas de frangos de postura comercial com doze semanas de idade.

O teste de triagem usado foi o de soroaglutinação rápida (SAR) em placas, utilizando-se de um antígeno disponível no comércio. Para melhor caracterizar a especificidade das reações, considerou-se somente os soros reagentes a partir da diluição 1:10. Na prova de diagnóstico foi utilizado um teste ELISA (Agritec Systems, Inc., Portland, Maine-USA), considerando-se positivos os títulos a partir de 1.050.

Para calcular a sensibilidade e a especificidade do teste, as frequências absolutas dos dados obtidos com o teste de SAR em placas e com o teste ELISA foram colocadas em tabelas de contingência de acordo com o tipo de criatório e com a idade da ave triada (Tabela 1).

Na avaliação da sensibilidade (S) e da especificidade (E) da prova de triagem foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Tabela 1. Formulas para calcular sensibilidade e especificidade do SAR.

Teste de Triagem	Teste de Diagnóstico		
	Doentes	Não doentes	Total
Positivos	a	b	a + b
Negativos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$S = \frac{a}{a + c} = p \frac{(T^+)}{(D^+)}$$

$$E = \frac{d}{b + d} = p \frac{(T^-)}{(D^-)}$$

A confiabilidade da S e da E da prova foi medida pelo Índice de Youden (1950), utilizando-se a seguinte fórmula: $S + E = 1$.

A probabilidade da diagnosticabilidade foi calculada usando-se o teorema de Bayes (Martin, 1976):

$$p(T^+)/(D^+) = \frac{p(D^+) \times p(T^+)/(D^+)}{[p(D^+) \times p(T^+)/(D^+)] + [p(D^-) \times p(T^+)/(D^-)]}$$

Para medir a interrelação de confiabilidade do teste de triagem para os diferentes tipos de criação e para as diferentes idades das aves triadas calculou-se o *Kappa* estatístico (*K*), de acordo com a fórmula proposta por Cohen (1960):

$$K = \frac{I_o - I_e}{1 - I_e}$$

O tratamento analítico dos dados constou do emprego do χ^2 (Snedecor & Cochran, 1967) através do qual se estudou a associação entre o tipo de criação e a idade das aves triadas.

Resultados e Discussão

Os resultados da SAR são mostrados na tabela abaixo (Tabela 2):

Observa-se que os frangos de corte com sete semanas de idade e os reprodutores com dezoito semanas de idade apresentaram as maiores freqüências de reagentes à prova da SAR para micoplasmose aviária. Os frangos de corte com três semanas de idade e os reprodutores com oito semanas de idade apresentaram valores intermediários de freqüência de reagentes. As menores freqüências de anticorpos anti-*Mycoplasma gallisepticum* foram observadas nos frangos de corte com duas semanas de idade e nas frangas de postura comercial com doze semanas de idade. O fato das aves com mais idade apresentarem as maiores freqüências de reagentes pode ser justificado pela facilidade com que o agente infeccioso se dissemina entre os lotes e as granjas, propiciando recontaminações (Kleven, 1992). Nota-se que as aves mais jovens mostram as mais baixas freqüências, o que permite confirmar a hipótese levantada por Oliveira et al. (1991), que afirma que estas observações se relacionam com os persistentes processos empregados na erradicação da doença nos criatórios avícolas, dentre elas o controle de trânsito, o manejo de dejetos, o controle de pragas, o intervalo entre lotes, o controle de matérias-primas, água e pintos (Inoue, 2005). Por outro lado, as aves com maior idade podem sofrer exposições freqüentes ao agente, devido a transmissão poder ocorrer por contato direto entre as aves, materiais contaminados e poeira (Inoue, 2005).

O Índice de Youden, para sensibilidade e especificidade, considera ser o melhor resultado aquele que mais se aproxima de 1 (Youden, 1950). Verifica-se na Tabela 3 que os frangos de corte com três e com duas semanas de idade e os reprodutores com oito semanas de idade apresentaram os melhores resultados, seguidos

Tabela 2. Frequência absoluta (N) e relativa (%) de aves reagentes e não reagentes à prova de SAR para micoplasmose aviárias, por *Mycoplasma gallisepticum*, de acordo com o tipo de criação e com a idade das aves triadas.

Tipo de Criação	Idade (semanas)	Reagentes		Não reagentes		Total
		N	%	N	%	
Frango de Corte	7	624	12,0	4.575	88,0	5.200
Frango de Corte	3	56	4,0	1.344	96,0	1.400
Frango de Corte	2	16	2,0	784	98,0	800
Frangas de Postura	12	6	2,0	294	98,0	300
Reprodutores	18	171	9,5	1.629	90,5	1.800
Reprodutores	8	120	3,0	3.880	97,0	4.000
Total		993	32,5	12.507	567,5	13.500

Tabela 3. Avaliação da sensibilidade (S) e especificidade (E) de uma prova de triagem para micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum* pelo método de SAR, de acordo com os diferentes tipos de criação e com as diferentes idades das aves triadas.

Tipo de Criação	Idade (semanas)	S (%)	E (%)	Índice de Youden
Frango de Corte	7	77,5	95,2	0,73
Frango de Corte	3	76,2	98,2	0,74
Frango de Corte	2	75,0	98,7	0,74
Frangas de Postura	12	66,7	98,7	0,65
Reprodutores	8	75,0	98,5	0,74
Reprodutores	18	75,6	94,0	0,70

pelos frangos de corte com sete semanas de idade e pelos reprodutores com dezoito semanas de idade. O pior resultado, segundo o mesmo índice, foi observado nas frangas de postura comercial. Rosales (1999) é da opinião que a sensibilidade e a especificidade são características intrínsecas do teste e reflete o grau de meticulosidade como este é conduzido. Assim, pelo Índice de Youden, pode-se acreditar na confiabilidade dos teste de SAR para detectar populações avícolas infectadas por *Mycoplasma gallisepticum*.

Verifica-se que a frequência de falso positivos neste estudo foi muito baixa (Tabela 4). O contrário foi observado com os falso negativos, que mostrou frequências elevadas para os diferentes tipos de criação e idades. As reações

falso positivas podem estar relacionadas ao fato do *Mycoplasma gallisepticum* ocupar o mesmo epitopo do *Mycoplasma synoviae*, podendo apresentar, dessa forma, reações cruzadas. Além disso, outras bactérias como o *Staphylococcus aureus* podem induzir reações falso positivas (Kleven, 1992). A alta frequência de reações falso negativas pode estar relacionada com a baixa sensibilidade do antígeno usado no teste de SAR. Estas reações constituem motivo de preocupação pois, uma vez não detectando a população contaminada, esta se constituirá em um foco de contaminação para as populações não infectadas, dificultando o controle sanitário.

A probabilidade de diagnosticabilidade (Tabela 5), segundo o Teorema de Bayes, foi

Tabela 4. Frequência de falsos positivos (FP) e de falsos negativos (FN) para um teste de triagem para micoplasmose aviária por *Mycoplasma gallisepticum* em diferentes tipos de criação e idades.

Tipo de Criação	Idade (semanas)	FP ¹ (%)	FN ² (%)
Frango de Corte	7	4,8	22,5
Frango de Corte	3	1,8	23,8
Frango de Corte	2	1,3	25,0
Frangas de Postura	12	1,4	33,3
Reprodutores	8	1,5	25,0
Reprodutores	18	6,0	24,4

Tabela 5. Probabilidade de doentes, desde que triados positivos em um teste para micoplasmose aviária por *Mycoplasma gallisepticum*, de acordo com o tipo de criação e idade das aves.

Tipo de Criação	Idade (semanas)	p (T ⁺)/(D ⁺) (%)
Frango de Corte	7	64,1
Frango de Corte	3	57,3
Frango de Corte	2	37,5
Frangas de Postura	12	33,6
Reprodutores	8	50,0
Reprodutores	18	66,1

Tabela 6. Resultados do Kappa estatístico e do teste de χ^2 , segundo as variáveis tipo de criação e idade das aves triadas pelo teste de SAR para *Mycoplasma gallisepticum*.

Tipo de Criação	Idade (semanas)	K	χ^2 *
Frango de Corte	7	0,665	2.353,3
Frango de Corte	3	0,642	580,5
Frango de Corte	2	0,493	174,7
Frangas de Postura	12	0,439	37,9
Reprodutores	8	0,590	1.454,0
Reprodutores	18	0,487	477,7

* Significativo ao nível de $p < 0,05$.

proporcionalmente menor nos frangos de corte com duas semanas de idade e nas frangas de postura comercial. Pode-se observar ainda que esta probabilidade foi maior nos reprodutores com dezoito semanas, seguidos pelos frangos de corte com sete semanas de idade e com três semanas de idade, juntamente com os reprodutores com oito semanas de idade.

Pelo *Kappa* estatístico obteve-se concordância substancial para os frangos de corte com sete e três semanas de idade e boa concordância para os demais tipos de criação e idades. Assim, esse índice permitiu medir a interrelação de confiabilidade do teste de triagem utilizado no estudo (Tabela 6).

Conclusões

Os dados aqui analisados permitem concluir que as aves reagem diferentemente às provas de triagem pelo teste de SAR, de acordo com o tipo de criação e com a idade dos lotes triados, sendo utilizada largamente como procedimento sorológico para aferir plantéis livres de *Mycoplasma gallisepticum* nas criações de frangos de corte, galinhas e outras aves reprodutoras.

Referências bibliográficas

- Buchala, F.G. **Levantamento sorológico de Salmonella e Mycoplasma em aves domésticas de criatórios de explorações não tecnificadas “fundo de quintal” no Estado de São Paulo**. Jaboticabal, Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2003. 67p. Dissertação (Mestrado em Veterinária).
- Cardoso A.L.S.P.; Tessari E.N.C.; Castro A.G.M. et al. Prova de soroglutinação rápida em galinhas reprodutoras como monitoria sorológica de micoplasmoses. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, p. 96-99, 2003.
- Cohen, J.A. Coefficient of agreement of nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**. v.20, p.37-38, 1960.
- Glisson, J.R.; Dawe, J.F.; Kleven, S.H. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of non-specific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. **Avian Dis.**, v.28, p.397-405, 1988.
- Harmad, I.; Kleven, S.H.; Snipes, A.P. et al. Sensitivity and specificity of *gallisepticum* agglutination antigens prepared from medium with liposomes substituting for serum. **Avian Dis.** v.32, n.3, p.519-526, 1988.
- Inoue, A.Y. Controle de enfermidades respiratórias em poedeiras comerciais. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, 2005. **Anais... FACTA**, 2005. p.191-210.
- Jacobson, R.H. How well of serum diagnostic tests predict the infection or diseases status of cats. **J. Am. Vet. Med. Ass.** v.199, n.10, p.1343-1347, 1991.
- Kleven, S.H. Aspectos clínicos e laboratoriais da micoplasmose aviária. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, 1990. **Anais...** 1999, p. 27-31.
- _____. Mycoplasmosis in avian industry: prevalent preoccupation. **Arbor Acres Services Bulletin**, n.31, 1992.
- _____. S.H. In: Sayf Y.M. et al. **Disease of Poultry**, p.719-774, 2003.
- Martin, S.W. The evaluation of testes. **Can. J. Comp. Med.**, v 41, n. 1, p. 19 – 25, 1976
- Mendonça, G.A.; Pólo, P.A.; Nascimento, E.R.; Lignon, G.B.A. Prova de SAR em galinhas poedeiras infectadas por micoplasmoses e salmonelose. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, 2003. **Anais...** 2003, p.116.
- Mendonça, G.A.; Nascimento, E.R.; Lignon, G.B., Pólo, P.A. O emprego de SAR e HI como rotina laboratorial para evidenciação de *Mycoplasma gallisepticum*. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, 2004, **Anais...** 2004, p.177.
- Nascimento, E.R. **Micoplasmoses**. In: Berchieri Júnior A.; Macari M. Doenças das Aves. p.217-224, 2000.
- Oliveira, R.L.; Resende, J.S.; Jorge, M.A. Levantamento sorológico em frangos de corte em Minas Gerais: 1985-1986. Artrite viral, doença respiratória crônica, sinovite infecciosa e pulrose-tifo aviário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, n.3, p.277-278, 1991.
- Pereira, M.S. & Silva, P.L. Prevalência de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em galinhas “caipiras” no município de Uberlândia-MG. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas - São Paulo, n.7. Suplemento, p.204-204, 2005.
- Rosales, A.G. Monitoria sorológica em aves. In: Conferência APINCO de ciências e tecnologia avícolas. 1999, Campinas, SP. **Anais...** 1999. v.1, p.46-52.
- Snedecor, G.W. & Cochran, W.G. **Statistical methods**. 6ed. Ames. Iowa State University Press, 1967. 593p.
- Youden, W.J. Index for reacting diagnostic tests. **Câncer**, v.3, p.32-35, 1950.