

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* NAS FÊMEAS SUÍNAS DO COMPLEXO AGROPECUÁRIO DA PALMA – PELOTAS/RS

**FISCH, Andressa<sup>1</sup>; GOMES, Charles Klazer<sup>1</sup>; MARCHIORO, Silvana B.<sup>1</sup>; GALLI, Vanessa<sup>1</sup>; MONTE, Leonardo<sup>1</sup>; SIMIONATTO, Simone<sup>1</sup>; JORGE, Sérgio<sup>1</sup>; STARK, Cledir<sup>1</sup>; DELLAGOSTIN, Odir<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio R.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular; <sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia/UFPel, Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354 – Pelotas – RS, CEP 96010-900. [dessafh@hotmail.com](mailto:dessafh@hotmail.com)

### INTRODUÇÃO

*Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Micoplásmica Suína (PMS), uma das mais comuns doenças respiratórias de suínos em todo o mundo. A PMS é caracterizada pela alta morbidade e baixa mortalidade, provocando queda na conversão alimentar e retardando o desenvolvimento de suínos na fase de crescimento e terminação, causando perdas econômicas consideráveis na suinocultura industrial (ROSS, 1999). O principal sinal clínico da doença é uma tosse típica e rápida que se inicia entre o 7º e o 14º dia após a infecção (ROSS, 1992; SORENSEN *et al.*, 1997). É transmitida principalmente por contato direto entre os suínos ou através de tosse e espirro (STEVENSON, 1998). A facilidade de disseminação do agente pode ser observada com a alta incidência da doença nos criatórios suínos em todo mundo, evidenciada em diversos levantamentos sorológicos já realizados (MORENO *et al.*, 1999; FANO *et al.*, 2005), o que também tem dificultado os ensaios com testes vacinais e de desafio em suínos. Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar o *status* sorológico e a ocorrência do agente na cavidade nasal das fêmeas pertencentes ao rebanho suíno do Complexo Agropecuário da Palma – Pelotas/RS, na tentativa de identificar um rebanho livre de contaminação, para possível utilização destes animais em testes vacinais contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

### METODOLOGIA

#### 1. Coleta e Processamento das Amostras

A presença do *M. hyopneumoniae* na mucosa nasal e o *status* sorológico para este agente foram avaliados em dez fêmeas do rebanho suíno do Complexo Agropecuário da Palma – Pelotas/RS. Os animais tinham uma idade média de um ano, todas fêmeas de primeira cria e não vacinadas contra PMS. Estavam alojadas em baias individuais grandes, sem uso de gaiolas de gestação, com intensa aeração, em boas condições de higiene e bem estar. Não apresentavam sinais clínicos respiratórios, e o rebanho não possuía histórico de doença respiratória recente. Procedeu-se a coleta de sangue através da utilização de sistema fechado a

vácuo, obtido por punção da veia coccígea. O sangue foi coletado sem o uso de anticoagulante, e o soro foi separado e estocado à -20°C até sua utilização. A coleta de material proveniente da mucosa nasal foi realizada através de *swab* estéril de ambas as narinas. O material proveniente foi acondicionado em 1 ml de PBS estéril e mantido em gelo para transporte. A extração de DNA dos *swabs* coletados foi realizada seguindo o protocolo descrito por Sibila *et al*(2006).

## 2. ELISA

Para verificar a presença de anticorpos anti-*M. hyopneumoniae* no soro destes animais foi realizado um ELISA com extrato da cepa 7448 de *M. hyopneumoniae*, utilizando microplacas de 96 cavidades. Para o teste, foram adicionados 100 µL de extrato de *M. hyopneumoniae* (1 µg/mL) em tampão carbonato/bicarbonato em cada cavidade. Após incubação *overnight* a 4°C e subsequente incubação à -70°C durante 2 horas, as placas foram descongeladas à temperatura ambiente, lavadas com PBS-T e incubadas com 200 µL de tampão de bloqueio 5% à 37°C por 2 horas. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com soro dos suínos (diluídos 1:100 em tampão de bloqueio) à 37 °C por 2 horas. Após lavar com PBS-T, as cavidades foram incubadas com anticorpo anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:6000 em tampão de bloqueio) à 37°C por 1 hora. A reação colorimétrica foi gerada com a adição de *ortophenylenediamine dihydrochloride* (Sigma) e peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos, a reação foi parada com a adição de 50 µL de 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância foi determinada em filtro de 492 nm em leitor de ELISA. A verificação da presença de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* nestes suínos também foi realizada através de um ELISA indireto. O protocolo utilizado foi semelhante ao descrito anteriormente, porém utilizando como antígeno a proteína recombinante P95 de *M. hyopneumoniae* produzida em *E. coli*, que foi caracterizada em estudos anteriores, demonstrando ser específica para *M. hyopneumoniae*, não reagindo com outras espécies de micoplasmas de suínos (SIMIONATTO, 2008). Para a validação do teste, o ponto de corte foi calculado pela média das absorbâncias das amostras negativas avaliadas, acrescidas de duas vezes o desvio padrão dessas amostras, separando assim as amostras positivas das negativas.

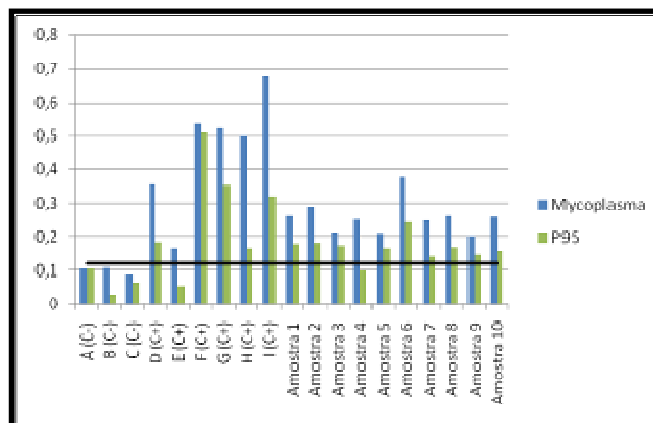
## 3. Nested-PCR

O DNA extraído dos *swabs* nasais foi utilizado para a realização de um Nested-PCR utilizando *primers* que amplificam o gene 16S rRNA deste microrganismo, conforme sugerido por Casamiglia (1999). Foram utilizados 5 µL do DNA extraído como *template* para a primeira PCR utilizando *primers forward* e *reverse* externos (F1 e R1) da reação de Nested-PCR e 0,5 µL do *amplicon* gerado na primeira PCR para realizar a segunda PCR com os *primers forward* e *reverse* internos (F2 e R2). Os parâmetros utilizados para ambas as reações foram os seguintes: volume final de 25 µl contendo 5 µL do DNA extraído do *swab*, 20 pmol de dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada *primer*, uma unidade de *Taq* DNA polimerase, 1 x tampão da enzima e 5% de glicerol. Para a segunda PCR, 0,5 µL do *amplicon* gerado na primeira PCR foram utilizados. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany), utilizando as seguintes condições: 7 minutos a 95 °C seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C e a extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para garantir a confiabilidade deste teste, foram testadas na primeira PCR,

combinações de *primers* (F1 + R2, F2 + R1 e F2 + R2) e realizada uma reação com H<sub>2</sub>O (controle negativo) e DNA previamente extraído de *M. hyopneumoniae* (controle positivo). Os controles negativos e positivos desta PCR também foram utilizados como *template* na segunda PCR. Além disso, foi realizado um controle onde o DNA foi substituído por PBS 1X utilizado para solubilizar os *swabs* e um controle de contaminação do ambiente onde foi utilizado um tubo de eppendorf que foi mantido aberto durante todo o procedimento de preparo das amostras para amplificação. O produto de cada PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em UV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

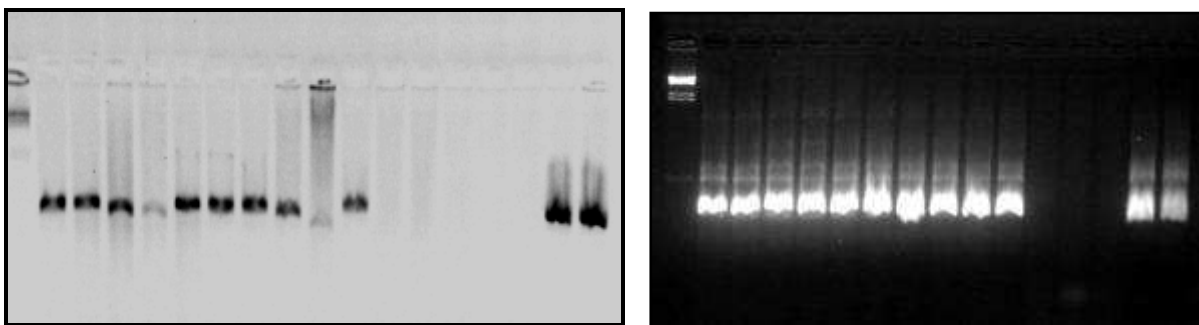
Pela técnica de ELISA, todos os soros reagiram tanto com o extrato da cepa de *M. hyopneumoniae* 7448, quanto com a proteína recombinante P95, revelando a presença de anticorpos contra este agente no soro destes animais, mesmo se tratando de um rebanho fechado, sem histórico da doença e sem a presença de sinais clínicos nos animais. O gráfico da figura 1 demonstra a reatividade dos soros, tanto com o extrato da cepa, quanto com a proteína recombinante. Todas as amostras ficaram acima do ponto de corte baseada nos controles negativos utilizados.



**Figura 1:** ELISA utilizando extrato de *M. hyopneumoniae* e a proteína recombinante P95 como antígeno. Detecção de anticorpos no soro de suínos. Anti-soro polivalente de suíno conjugado com peroxidase (diluído 1:6000) foi usado como anticorpo secundário. Os dados representam a média da OD<sub>492</sub>. A-C: soros controles negativos. D-I: soros controles positivos. Amostra 1-10: soros dos animais avaliados. O ponto de corte (linha preta) representa à média dos soros negativos + 2 desvio padrão. Os valores iguais ou superiores ao ponto de corte foram considerados positivos.

A eletroforese em gel de agarose do produto obtido no Nested-PCR demonstrou a ocorrência de uma banda de mesmo tamanho que o controle positivo em todas as amostras já na primeira etapa do Nested-PCR, utilizando os *primers* externos. Porém, as amostras 4 e 9 apresentaram um padrão menos intenso que os demais. Para confirmar o resultado, uma segunda etapa foi realizada, utilizando os *primers* internos (figura 2).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 14 15 18 16 17



**Figura 2.** Gel de agarose 1% demonstrando a amplificação do gene 16S rRNA de *M. hyopneumoniae* na primeira (A) e segunda (B) reações de *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII; Amostras 1-10: DNA extraído do swab nasal dos suínos; 11: amostra 1 com primers F1/R2; 12: amostra 2 com primers F2/R1; 13: amostra 3 com primers F2/R2; 14: água (controle de reação); 15: PBS utilizado no acondicionamento das amostras de swab nasal (controle negativo); 16 e 17: DNA de *M. hyopneumoniae* (controle positivo); 18: tubo de *ependorf* aberto durante procedimento de amplificação (controle negativo).

Nesta, todas as amostras apresentaram amplificação com uma banda na mesma altura do controle positivo, em mesma intensidade, indicando a positividade de todos os animais para a contaminação por *M. hyopneumoniae*. Em ambas as reações os controles negativos não apresentaram amplificação de qualquer tamanho, excluindo a possibilidade de contaminação da reação por DNA externo.

## CONCLUSÕES

Embora o isolamento de *M. hyopneumoniae* seja o padrão ouro para detecção do microrganismo, o isolamento apresenta variáveis que dificultam sua utilização como método diagnóstico de rotina. A utilização de variantes da PCR em conjunto com métodos sorológicos, e com o histórico clínico do rebanho constitui a melhor forma de avaliar a presença de *M. hyopneumoniae* nos rebanhos suínos. Os resultados acima mencionados demonstraram a presença de infecção por *M. hyopneumoniae* em todos os animais do grupo estudado. Isso demonstra a ocorrência da infecção em rebanhos que vivem em condições desfavoráveis para a propagação do microrganismo, demonstrando a alta prevalência do agente, mesmo em propriedades de pequena produção, onde as práticas de um sistema de criação intensivo não são aplicáveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASAMIGLIA, M., *et al.* Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 1999, v. 11, p.246-251.
- FANO, E., *et al.* Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, 2005, v. 69, p.223-228.
- MORENO, A., *et al.* Levantamento sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. **Anais IX ABRAVES**, 1999, p.161-162.
- ROSS, R. Mycoplasmal diseases. In: AD Leman, B Strawand WL Mengeling, editors. **Diseases of Swine**. Ames (IA): Iowa State University Press, 1999, p. 537–55.
- ROSS, R. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E., Allaire, S.D., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), **Disease of swine**, Iowa State University Press, Ames, 1999, p. 495-509.

SIBILA, M., *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs: an exploratory field study. In: **International Pig Veterinary Society Congress**, (IPVS) Copenhagen, Denmark. 2006.

SIMIONATTO S. **Produção e caracterização de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* com potencial para uso em imunodiagnóstico e vacinação.** 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - UFPel/RS, Pelotas, 2008.

SORENSEN, V., *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**. 1997, v. 54, p.23–34.

STEVENSON, G.W. Bacterial pneumoniae in swine. In: **International Practitioner Veterinary Society (IPVS)**, Birmingham, England. 1998, p.11–20.