

PREVALÊNCIA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM AMOSTRAS DE PULMÃO DE SUÍNOS DA REGIÃO SUL DO PAÍS COLETADAS EM FRIGORÍFICO

VIOLETTA DIAS PACCE¹; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; SÉRGIO JORGE²; ODIR ANTÔNIO DELLAGOSTIN³

¹Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPEL – violettapacce@gmail.com;

²Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPEL – oliveira_natasha@hotmail.com;
sergiojorgevet@hotmail.com;

³Laboratório de Vacinologia, CDTec, UFPEL – odirad@terra.com.br;

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES) (THACKER; MINION, 2012). A PES é caracterizada por tosse crônica não produtiva, redução das taxas de crescimento, piora da conversão alimentar e retardo no ganho de peso, apresentando alta morbidade e baixa mortalidade (VRANCKX et al., 2012). Além disso, infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae* geram significativas perdas econômicas, direta ou indiretamente, através do aumento da susceptibilidade dos suínos a outros patógenos respiratórios (MAES et al., 2017). A PES é altamente prevalente (variando entre 65% e 93,6%), sendo distribuída em quase todas as áreas de produção suinícola do mundo (FABLET et al., 2012). Animais em fase de terminação são mais afetados e a severidade dos sinais clínicos pode ser influenciada por diversos fatores, como a virulência da cepa, o número de microrganismos presentes, ocorrência de infecções secundárias e as condições de manejo (SIBILA et al., 2009).

Diversas metodologias são utilizadas para diagnosticar a infecção. Sinais clínicos e lesões patológicas são considerados de diagnóstico presuntivo, sendo necessários testes laboratoriais para obter um diagnóstico conclusivo (SIMIONATTO et al., 2013). A cultura do *M. hyopneumoniae* é considerada o padrão ouro para a confirmação do diagnóstico (THACKER, 2004). Porém, o isolamento desse patógeno é fastidioso, requerendo um longo período de incubação, além da constante contaminação com outros micoplasmas também presentes no trato respiratório suíno (MAES et al., 2017). Métodos para identificação de anticorpos como testes de ELISA e imunofluorescência indireta são bastante utilizados, mas apresentam baixa sensibilidade e reações cruzadas com outros micoplasmas (YAMAGUTI; MULLER; PIFFER, 2008).

O desenvolvimento de ensaios de PCR forneceu um método de detecção mais sensível e específico, que pode ser utilizado em amostras de tecido pulmonar, *swab* nasal ou lavagens bronquiais (THACKER; MINION, 2012). O Nested-PCR, consiste em uma variação do PCR convencional e vem sendo utilizado para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (YAMAGUTI; MULLER; PIFFER, 2008), uma vez que utiliza dois conjuntos de *primers* específicos para o gene do RNA ribossomal 16S de *M. hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo realizar o Nested-PCR e avaliar a prevalência do *M. hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos da região sul do RS coletadas em frigorífico.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta, processamento e score de lesões pulmonares. Foi realizada uma coleta de 30 amostras de pulmões de suínos provenientes de um frigorífico localizado na cidade de Pelotas, o qual recebe suínos oriundos de granjas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Um total de 30 amostras foram obtidas e transportadas até o Laboratório de Vacinologia da Universidade Federal de Pelotas para processamento. Áreas do tecido pulmonar adjacentes às lesões características da PES foram cortadas e armazenadas em freezer -70 °C para posterior extração de DNA. O score das lesões macroscópicas foi pontuado de acordo com o método descrito por (HANNAN; BHOGAL; FISH, 1982).

2.2 Extração de DNA e Nested-PCR. O DNA foi extraído diretamente das amostras de tecido pulmonar utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). O DNA extraído (2 µl) foi utilizado para a primeira reação de Nested-PCR, a qual foi realizada com *primers* que amplificam uma região de 649 pb do gene do RNA ribossomal 16S (MATTSSON et al., 1995). Na segunda reação, foram utilizados 0.5 µl do produto amplificado com *primers* específicos (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999) que amplificam uma região interna de 352 pb do mesmo gene (Tabela 1). Como controle positivo foi utilizado a cepa referência de *M. hyopneumoniae* 7448 (VASCONCELOS et al., 2005). Ambas reações foram preparadas para um total de 25 µl e corridas em termociclador com as seguintes condições: 30 ciclos de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, anelamento dos *primers* à 60 °C por 45 segundos, e extensão à 72 °C por 30 segundos.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados no Nested-PCR.

Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Primers externos</i>		
MYHO FOR	GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA	649
MYHO REV	TGTGTTAGTGACTTTTGCCACC	
<i>Primers internos</i>		
N-MHYO FOR	ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT	352
N-MHYO REV	GTGGACTACCAGGGTATCT	

2.3 Eletroforese em gel de agarose. Aliquotas de 5 µl dos *amplicons* da segunda reação foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente corado em brometo de etídio. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 30 amostras coletadas no presente trabalho, 27 foram positivas através do método de diagnóstico por Nested-PCR, demonstrando a presença do microrganismo em 90% das amostras. Todas as amostras positivas apresentaram amplificação visível em gel de agarose na segunda reação, cujo *amplicon* corresponde a um fragmento de 352 pb (Figura 1).

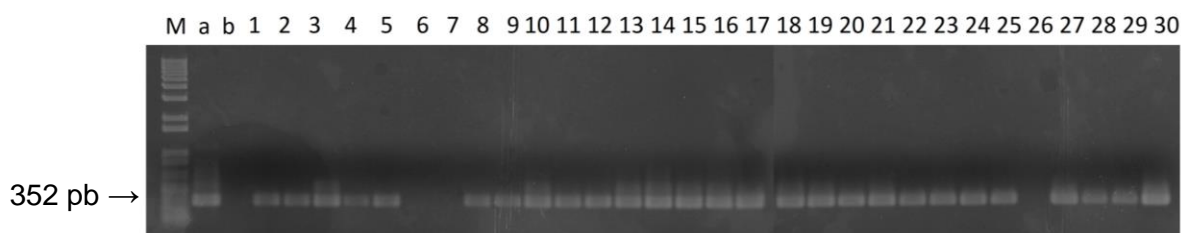


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder); (a) controle positivo (DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448); (b) controle negativo (água estéril); 1 – 30 amostras de tecido pulmonar coletadas em frigorífico.

Em relação à análise das lesões pulmonares, 43% das amostras apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de *M. hyopneumoniae* (Tabela 2). A média dos scores positivos (acima de zero) foi 2,89, sendo que o maior score observado foi 6,41. As três amostras negativas para *M. hyopneumoniae* no Nested-PCR não apresentaram lesão pulmonar, confirmando o diagnóstico negativo. Todas as amostras com score acima de zero foram positivas no Nested-PCR.

Tabela 2. Resultados do Nested-PCR e score de lesões pulmonares (média±SD).

Amostras	Nested-PCR (%)	Score (%)	Média±SD
Positivas	27 (90)	13 (43)	2,89±1,8
Negativas	3 (10)	17 (57)	-
Total	30 (100)	30 (100)	

*Média + Desvio Padrão (SD) dos scores das lesões determinados conforme Hannan et al. (1982), onde os valores variam de 0 (sem lesão) a 35 (pulmão inteiro afetado).

Como esperado, o Nested-PCR demonstrou-se uma técnica sensível, detectando pequenas quantidades do DNA do microrganismo (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999). Esta técnica é capaz de detectar a presença do agente em amostras que não apresentaram lesões macroscópicas sugestivas de PES. A elevada prevalência de *M. hyopneumoniae* em suínos de abate vem sendo reportada (FABLET et al., 2012; SIBILA et al., 2007) e pode ser influenciada pelas condições de manejo e alojamento dos animais, principalmente quando provenientes regiões próximas devido à transmissão por via aérea do patógeno (MAES et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho demonstram a alta prevalência da PES em animais provenientes de granjas do estado do Rio Grande do Sul, trazendo informações que podem contribuir para a compreensão da epidemiologia da doença e para estabelecimento de medidas de controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 251, n. 1999, p. 246–251, 1999.
- FABLET, C. et al. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 152–163, 2012.
- HANNAN, P.C., BHOGAL, B.S. & FISH, J. P. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. **Research in veterinary science**, v. 33, n. 1, p. 76–88, 1982.
- MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297–309, jan. 2008.
- MAES, D. et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. March, p. 1–15, 2017.
- MATTSSON, J. G. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 893–897, 1995.
- SIBILA, M. et al. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p. 97–107, 2007.
- SIBILA, M. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 221–231, 2009.
- SIMIONATTO, S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 234–242, 2013.
- THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 5, n. 2, p. 317–320, 2004.
- THACKER, E. L.; MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: **Diseases of Swine, 10th Edition**. p. 779–797, 2012.
- VASCONCELOS, A. T. R. et al. Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of. **Microbiology**, v. 187, n. 16, p. 5568–5577, 2005.
- VRANCKX, K. et al. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3–4, p. 315–321, 2012.
- YAMAGUTI, M.; MULLER, E. E. E.; PIFFER, A. A. I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 471–476, 2008.