

## ISOLAMENTO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A PARTIR DE AMOSTRAS DE PULMÃO DE SUÍNOS COLETADAS EM FRIGORÍFICO

CHARLES KLAZER GOMES<sup>1</sup>; ANDRESSA FISCH<sup>1</sup>; SILVANA B. MARCHIORO<sup>1</sup>;  
NATASHA OLIVEIRA<sup>1</sup>; ANA CAROLINA PEITER<sup>1</sup>; ODIR ANTONIO  
DELLAGOSTIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – [charlesklazer@hotmail.com](mailto:charlesklazer@hotmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – [odirad@terra.com.br](mailto:odirad@terra.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

*Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente causador da pneumonia enzoótica suína (PES), uma doença respiratória crônica que acomete suínos no mundo todo, causando perdas econômicas significativas (Thacker e Minion, 2010). A PES é uma doença contagiosa caracterizada por uma broncopneumonia catarral que, clinicamente manifesta-se por tosse seca crônica, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade afetando suínos de todas as idades (Sobestiansky et al., 1999).

O controle da infecção de *M. hyopneumoniae* pode ser realizado de diferentes maneiras dentre as quais se destacam as boas práticas de manejo e das condições de alojamento, o uso de antimicrobianos e a vacinação dos animais (Maes et al., 2008). No entanto, a vacinação parece ser a forma mais efetiva de controlar a PES (Lin et al., 2003). As vacinas comerciais disponíveis são constituídas de células totais inativadas (bacterinas) e por isso apresentam um elevado custo de produção. Estas vacinas conferem proteção parcial aos suínos (Haesebrouck et al., 2004), caracterizada pela redução das lesões, porém não reduzem a colonização (Sibila et al., 2008)

Dessa forma, para obtenção de uma vacina com maior especificidade e efetividade, o isolamento e caracterização antigênica de cepas infectantes em diferentes rebanhos torna-se uma estratégia importante no controle da PES. No entanto, o isolamento desse microrganismo é complicado pela sua natureza extremamente fastidiosa e de crescimento lento (Mattsson et al., 1995). Um dos grandes problemas encontrados no isolamento de cepas de *M. hyopneumoniae* é a presença de outros micoplasmas no trato respiratório dos suínos, como o *M. hyorhinis* e *M. flocculare* (Ross, 1999). Vários estudos demonstraram que cepas de *M. hyopneumoniae* isoladas de diferentes rebanhos mostraram diferenças proteômicas (Calus et al., 2007), genômicas (Madsen et al., 2007) e na virulência (Vicca et al., 2003).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo o isolamento de cepas de *M. hyopneumoniae* a partir do cultivo de amostras de pulmões de suínos provenientes de diferentes granjas do Rio Grande do Sul e coletados em um frigorífico na cidade de Pelotas, RS, para posterior caracterização molecular para conhecimento da diversidade genética destes isolados.

### 2. METODOLOGIA

**2.1 Coleta e processamento das amostras.** Amostras de pulmão, com lesões características de PES, foram coletadas em um frigorífico de inspeção estadual, o qual recebe suínos provenientes de granjas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram realizadas 4 coletas em diferentes dias, obtendo um total de 50

amostras. Áreas do tecido pulmonar adjacentes as lesões foram cortadas e maceradas com 5 ml de meio NHS20 (Meio Friis suplementado com 10% soro suíno e 10% soro equino).

**2.2 Cultivo.** O macerado pulmonar foi diluído em meio de cultivo NHS25 (Meio Friis suplementado com 12,5% soro suíno e 12,5% soro equino) e cultivado em placas de 96 cavidades. Um volume de 20 µl das alíquotas filtradas, com filtro 0,45 µm, e não filtradas foram adicionados em 180 µl de meio em cada poço e diluídos até 10<sup>-4</sup>. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C até ser notado o crescimento de micoplasma pela acidificação do meio. Estas amostras foram então repicadas em micro tubos com 500 µl de meio NHS20 e incubados novamente em estufa a 37 °C.

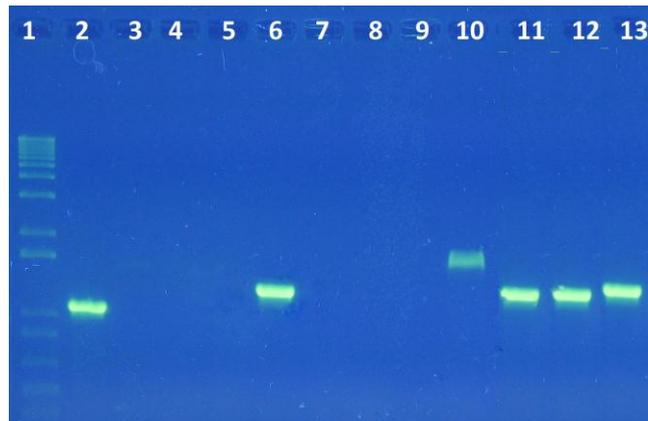
**2.3 Extração de DNA e PCR.** O DNA dos cultivos foi extraído utilizando o kit *illustra™ Bacteria genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare). O DNA extraído foi utilizado em uma reação de PCR para detectar a presença de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* ou *M. flocculare* utilizando *primers* espécie específicos (Tabela 1) (Stakenborg et al., 2006).

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*

Nome do <i>primer</i>	Sequência
M HYOP FOR	5'TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC3'
M FLOC FOR	5'GGGAAGAAAAAATTAGGTAGGG3'
M HYOR FOR	5'CGGGATGTAGCAATACATTCAG3'
M REV	5'AGAGGCATGATGATTTGACGTC3'

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras de pulmão que apresentavam lesão característica de *M. hyopneumoniae*, pôde ser observada a acidificação do meio em 12 amostras, das quais 7 foram PCR positivas para o gênero *Mycoplasma* (Figura 1). Destas 7, todas foram positivas para uma ou mais espécies de micoplasma (Tabela 2). apenas uma amostra foi positiva somente para *M. hyopneumoniae*. O *M. hyorhinis* se fez presente em 80% das amostras positivas para *M. hyopneumoniae*. Essa espécie se sobrepõe ao crescimento de outros micoplasmas em meio de cultivo, o que dificulta o isolamento de uma única espécie. Além disso, o baixo sucesso no cultivo de *M. hyopneumoniae* a partir de lesões de pulmão pode se dar devido a presença de diferentes microrganismos, aumentando as chances de contaminação do meio de cultivo, agravado pelo fastidioso crescimento desta bactéria. Clonagens em meio NHS20 sólido se fazem necessárias para que possamos obter um isolado puro para posterior caracterização molecular.



**Figura 1.** Gel de agarose corado com Blue-Green de algumas amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma*. 1, Marcador de peso molecular 1 kb; 2, 5, 8 e 11, Amostras com *primer* para *M. flocculare*; 3, 6, 9 e 12, Amostras com *primer* para *M. hyopneumoniae*; 4, 7, 10 e 13, Amostras com *primer* para *M. hyorhinis*.

**Tabela 2.** Amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma*.

Amostras	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. flocculare</i>
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	-	-	+
5	+	-	-
6	-	+	-
7	+	+	+

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível observar dificuldade para se obter o crescimento de *M. hyopneumoniae in vitro*, bem como seu isolamento. Observou-se também a incidência de co-infecções dos animais provenientes de granjas do Rio Grande do Sul por outras espécies de *Mycoplasma*, principalmente por *M. hyorhinis*. Tentativas de isolamento dessas amostras positivas para *M. hyopneumoniae* já estão sendo realizadas em meio NHS20 sólido para posterior caracterização molecular dos isolados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALUS, D.; BAELE, M.; MEYNS, T.; DE, K.A.; BUTAYE, P.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.284-291, 2007.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255-268, 2004.
- LIN, J.H.; WENG, C.N.; LIAO, C.W.; YEH, K.S.; PAN, M.J. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.69-74, 2003.
- MADSEN, M.L.; ONEAL, M.J.; GARDNER, S.W.; STRAIT, E.L.; NETTLETON, D.; THACKER, E.L.; MINION, F.C. Array-based genomic comparative hybridization analysis of field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7977-7982, 2007.
- MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.297-309, 2008.
- MATTSSON, J.G.; BERGSTROM, K.; WALLGREN, P.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.893-897, 1995.
- ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. **Diseases of Swine**. Ed. 8<sup>º</sup>, Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.495-510, 1999.
- SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v.127, p.165-170, 2008.
- STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; PEETERS, J.; KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. A Multiplex PCR to Identify Porcine Mycoplasmas Present in Broth Cultures. **Veterinary Research Communications**, v.30, p.239-247, 2006.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. Pneumonia enzoótica. **Clínica e Patologia Suína**. 2<sup>a</sup> ed., Art 3 Impressos Especiais, Goiânia, Goiás, p.359, 1999.
- THACKER, E.L.; MINION, F.C. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press: Ames, 2010. p.779-797.
- VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; DE, K.A.; HAESEBROUCK, F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.177-190, 2003.