

## INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE SUÍNOS PARA PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae*

Klein, C.S.<sup>1</sup>; Rebelatto, R.<sup>1</sup>; Bellaver, F.V.<sup>1</sup>; Locatelli, C.<sup>2</sup>; Mores, M. A.<sup>1</sup>; Morés, N.; Coldebella, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves; <sup>2</sup>CNPq  
E-mail: catia@cnpsa.embrapa.br

**PALAVRAS-CHAVE:** ELISA, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Pneumonia Enzoótica.

### INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) é o agente primário da Pneumonia Enzoótica (PE) em suínos, doença respiratória crônica que causa elevada morbidade e baixa mortalidade, e está distribuído mundialmente causando grandes perdas econômicas na suinocultura (1). Os testes de ELISA são de uso corrente para PE e nesses são utilizados extratos da bactéria (2) ou antígenos recombinantes produzidos a partir da expressão de genes de Mh (4). Os testes de ELISA medem a resposta do animal para a presumida resposta do agente e, portanto, a ocorrência de falsos positivos pode existir, uma vez que a especificidade dificilmente é total, em função da ocorrência de reações cruzadas com outros agentes microbianos ou não detectar animais recentemente infectados (falsos negativos) (2). Alguns testes estão disponíveis comercialmente e apresentam excelente especificidade, com pouquíssimos falsos positivos, mas a sensibilidade desses kits foi baixa apresentando vários falsos negativos (3).

### MATERIAL E MÉTODOS

A fim de obter controles para padronização de um teste de ELISA para detecção de anticorpos contra Mh a partir de soro, 06 suínos *Specific Pathogen Free* (SPF), 03 com 30 dias de idade (animais 1, 2 e 3) e 03 com 40 dias de idade (animais 4, 5 e 6), foram desafiados por 03 dias consecutivos com 10mL/dia/suíno de cultivo de Mh cepa 7448 padronizado para conter aproximadamente  $1 \times 10^6$  CCU/mL. Quarenta e cinco dias pós a 1ª inoculação (d.p.i.) foi repetida a série de 03 inoculações dos suínos desafiados aos 30 dias de idade e 30 d.p.i foi repetida a série de inoculações dos suínos desafiados aos 40 dias de idade. Sendo que, anteriormente às inoculações, foram coletados sangue e suabe de tonsila de todos os animais, com repetição quinzenal até o sacrifício dos animais aos 132 d.p.i. para os suínos desafiados aos 30 dias de idade e 125 d.p.i. para os suínos desafiados aos 40 dias de idade. Ainda, foram observados os sinais clínicos dos animais durante o período do desafio, no sacrifício foram observadas a presença de lesões macroscópicas sugestivas de PE e coletado fragmento de pulmão para tentativa de isolamento de Mh, para imunoistoquímica (IHQ) e para exame histopatológico. Com os suabes de tonsila coletados foi realizada extração de DNA pelo método BOOM *et al.* (1990) e posterior *nested*-PCR para detecção de Mh. Com os soros, foram realizados testes de ELISA utilizando um kit comercial para detecção de anticorpos contra Mh e o teste em fase de padronização pela Embrapa Suínos e Aves. O teste em padronização utiliza antígeno extraído com Tween 20 a partir de uma cultura de Mh, seguindo os protocolos estabelecidos, diluído 1:2000, soro anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase diluído 1:40.000. As amostras foram processadas em triplicata e o resultado da mediana foi avaliado em relação a um ponto de corte de densidade óptica (DO) de 0,422, definido pelas médias de DOs de três categorias de animais (maternidade, creche e crescimento), mais três desvios-padrão.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais desafiados apresentaram PCR positiva para Mh na coleta realizada antes do sacrifício, sendo que 30 d.p.i já foi possível a detecção de Mh por *nested*-PCR em alguns animais. Dos animais desafiados aos 30 dias de idade, nenhum apresentou sinais clínicos de PE, nem lesão observada ao sacrifício. Dos animais desafiados aos 40 dias de idade, 02 apresentaram sinais clínicos de PE (animais 5 e 6, Fig.1) e também não houve lesão macroscópica. Um terceiro animal (animal 4, Fig.1) desafiado aos 40 dias de idade, no qual não foram observados sinais clínicos de PE, apresentou lesões de consolidação de graus 1 e 2 nos lobos apicais e cardíacos, respectivamente, com IHQ positiva (+++) para Mh e exame histopatológico com alterações características de PE. O reisolamento bacteriológico de Mh a

partir do pulmão do animal 4 ainda não foi confirmado, por ser um procedimento fastioso, mas a *nested-PCR* para Mh do cultivo apresentou resultado positivo. Assim, o protocolo para o desafio de suínos com Mh que permitiu o desenvolvimento da doença e coleta de material para reisolamento do agente, foi o utilizado nos animais desafiados aos 40 dias de idade. Uma vez que a diferença de 10 dias na idade dos animais desafiados não parece ser fator determinante para o sucesso do desafio e, tendo sido utilizado o mesmo inóculo em ambos os testes, acreditamos que o diferencial é o prazo entre a 1ª e a 2ª séries de inoculações. Quanto ao ELISA, em padronização, foi utilizado um ponto de corte estipulado com base em coletas a campo considerando o perfil de granjas positivas e negativas para PE. Nenhum animal desafiado aos 30 dias de idade apresentou soroconversão pelo teste de ELISA em padronização, mas dois animais, um aos 92 d.p.i e outro aos 106 d.p.i. soroconverteram utilizando o *kit* comercial. Dos animais desafiados aos 40 dias de idade (animal 5 e 6 – sem lesões), ambos soroconverteram aos 99 d.p.i utilizando o teste em padronização e utilizando o *kit* comercial um soroconverteu aos 70 d.p.i e outro aos 57 d.p.i. Já o animal 4 (com lesão), apresentou ELISA negativo para o teste em padronização (DO em ascensão, Fig. 1) e soroconverteu aos 112 d.p.i. no teste com o *kit* comercial.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, o protocolo ideal consiste em realizar a 1ª série de inoculações em animais jovens (entre 30 e 40 dias de idade), a 2ª série de inoculações 30 d.p.i. e o sacrifício aproximadamente 130 d.p.i. Os animais que apresentavam sinais clínicos de PE, provavelmente, desenvolveriam a lesão em pouco tempo. Quanto à sorologia, aparentemente, este ponto de corte é muito elevado, se comparado ao *kit* comercial que foi mais sensível em todas as amostras, acusando amostras positivas não identificadas pelo teste em padronização, indicando a necessidade de melhorias e mais estudos em novas amostragens.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) MAES, D; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **The Veterinary Quarterly**, v.18, n.3, p.104-109, 1996. (2) RAUTIAINEN E. The prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds in western Finland base don the demonstration of antibodies in colostrum by ELISA. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p. 325-30, 1998. (3) ERLANDSON, K.R.; EVANS, R. B.; THACKER, B. J. Evaluation of three serum antibody enzyme-linkedimmunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production** v. 13, n. 4, p. 198-203, 2005.(4) SUBRAMANIAM, S.; FREY, J.; HUANG, B.; DJORDJEVIC, S.; KWANG, J.. Immunoblot assays using recombinant antigens for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 99-106, 2000.

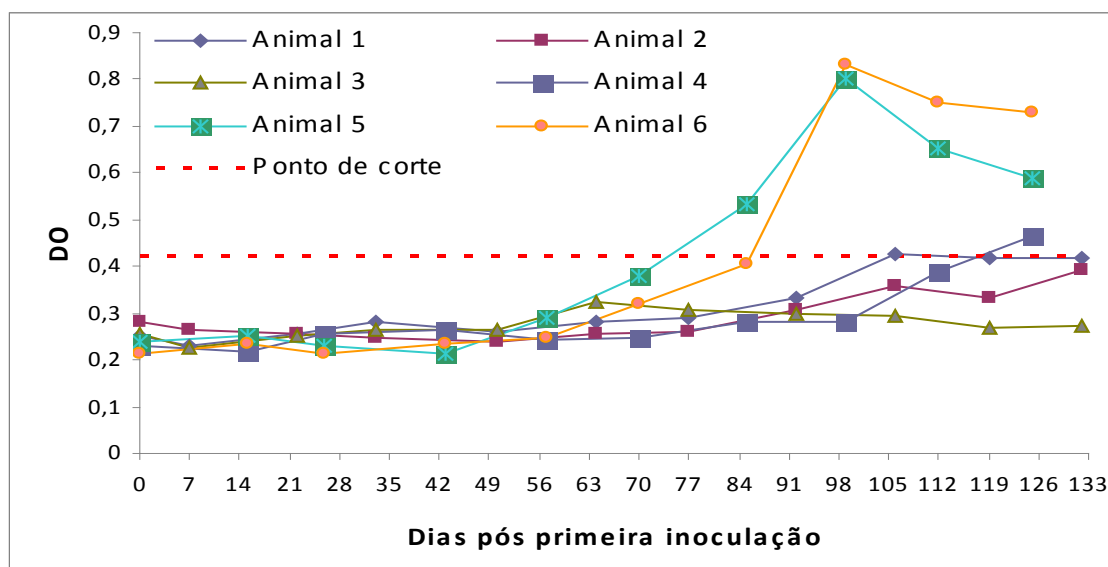


Figura 1. Resultado em DO dos ensaios realizados com o teste de ELISA em padronização