

# COMPARAÇÃO ENTRE O USO DE TESTE DE ELISA E OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS

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>; Amaral, A. L.<sup>1</sup>; Ciacci-Zanella, J. R.<sup>1</sup>

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

**PALAVRAS-CHAVE:** ELISA, *Mycoplasma hyopneumoniae*, suínos, PCR, imunistoquímica

## INTRODUÇÃO

A detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) e o controle da infecção causada por este patógeno dependem da disponibilidade de métodos de diagnóstico apropriados que apresentem elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (2). Estes métodos de diagnóstico são essenciais para a determinação do perfil sanitário dos rebanhos de suínos, principalmente, para aqueles responsáveis pelo melhoramento genético e multiplicação de animais melhorados (1). A técnica “padrão ouro” para o diagnóstico é o isolamento do agente, porém, este é extremamente difícil e laborioso (2), não sendo utilizada como método de rotina. Diversos métodos alternativos para detecção de Mh foram divulgados, no entanto, a maioria apresenta limitações. Sorologia por teste de ELISA e detecção por PCR, além de avaliações *post mortem* de pulmão em abatedouro ou achados de necropsia são algumas das técnicas usadas para monitorar a incidência da infecção por Mh (4). O teste de ELISA é um dos mais utilizados, pois fornece a informação a respeito da presença ou ausência de anticorpos maternos e adquiridos, bem como determina o período da soroconversão, sendo um teste rápido, de baixo custo e facilmente automatizado (3).

## MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de padronizar um teste de ELISA com antígeno extraído com Tween 20 e definir a dinâmica da infecção por Mh, foram visitadas 13 granjas, sendo 8 com perfil sanitário positivo para Mh (com histórico da presença de Mh e sinais clínicos) e vacinadas para PE e 5 granjas com perfil sanitário negativo para Mh (com histórico de ausência de Mh se sem sinais clínicos aparentes) e não vacinadas para PE. De cada granja, foram coletadas 90 amostras de sangue e de suabe de tonsila de 15 animais de cada uma das seguintes idades (aproximadas): 20, 40, 70, 90, 120 e 150 dias. As amostras de soro foram submetidas ao teste de ELISA, seguindo protocolo em padronização na Embrapa Suínos e Aves, com ponto de corte (PC) de 0,422 para animais de creche, maternidade e crescimento e PC de 0,549 para animais de terminação. Os PC foram definidos pelas médias de DO, de acordo com o perfil das granjas, com três desvios-padrão. Com os suabes de tonsila coletados foi realizada extração de DNA pelo método de BOOM *et al.* (1990) e posterior *nested*-PCR para detecção de Mh. De cada granja, foi realizado seqüenciamento de DNA de uma amostra *nested*-PCR positiva, para confirmação do resultado. Ainda, de 3 das 8 granjas positivas para Mh e de 2 das 5 granjas negativas foram sacrificados animais e observada a presença de lesões macroscópicas sugestivas de PE, realizada a avaliação do índice de pneumonia enzootica (IPP/IP) e coletado fragmento de pulmão para realização de imunistoquímica (IHQ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, com os métodos utilizados, somente a granja 3 manteve o perfil negativo (Tab. 1 e Tab. 2). A granja 12 apresentou IHQ positiva apenas para uma amostra, que corresponde ao 1º pulmão analisado, assim, acreditamos que o pulmão analisado, coletado em frigorífico, era do lote anterior de animais e será preciso realizar nova coleta de material na granja. Todas as granjas com PCR positiva tiveram o resultado confirmado pelo seqüenciamento.

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite concluir que quando o resultado do IPP é elevado, a porcentagem (%) de amostras positivas no ELISA aumenta e diminui a % de amostras positivas na PCR (Figura 1). Assim a melhor forma de avaliar a presença ou ausência do Mh nas granjas, bem como de controlar a infecção, é combinando vários métodos diagnósticos e realizar a análise conjunta de todos os dados. Isto porque, a PCR é importante para detectar a presença do agente quando a soroconversão não pode ser detectada por ELISA, mas pode fornecer falsos negativos quando a infecção estiver em estágio evoluído e que o agente não está mais nas tonsilas do animal.

Já a junção do ELISA, com o IPP e IHQ confirmam um diagnóstico positivo ou negativo em granjas onde a infecção já está em estágio avançado.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) DUTRA, V.; PIFFER, I.; CASTAGNA DE VARGAS, A.; GUIDONI, A.; KLEIN, C. Padronização do teste ELISA baseado em antígeno capsular purificado dos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.281-286, 2000. (2) MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; LEIN, A.; VRIJENS, B.; DE KRUIF, A.. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. **Journal of Veterinary Medicine**, B 45, p.495–505, 1998. (3) 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. (4) THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; JANKE, B.H.. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2525–2530, 2001.

**Tabela 1.** Avaliação IHQ e IPP em relação ao perfil da granja e vacinação para PE

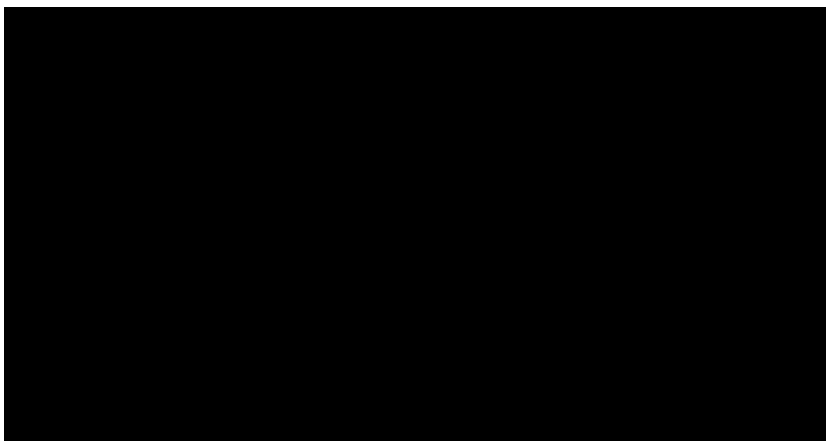
Granja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Perfil</b>	P	P	N	P	P	P	N	P	N	P	N	N	P
<b>Vacina</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim
<b>IHQ</b>	P	P	N	P	NR	NR	NR	NR	P	NR	N	P	P
<b>IPP</b>	0,89	1,87	0,17	NR	NR	NR	NR	NR	0,22	NR	0,29	0,11	2,94

P: positivo, N: negativo, NR: não realizado

**Tabela 2.** Avaliação ELISA e PCR positivos por categoria animal

Granja	ELISA (%)				PCR (%)			
	Creche	Mat.	Cresc.	Term.	Creche	Mat.	Cresc.	Term.
1	100,00	100,00	35,71	31,25	0,00	0,00	0,00	50,00
2	6,67	NR	42,86	80,00	20,00	NR	14,29	53,33
3	0,00	0,00	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	73,33	0,00	65,52	79,31	13,33	6,67	37,93	51,72
5	0,00	0,00	10,00	66,67	6,67	6,67	23,33	40,00
6	6,67	0,00	16,67	80,00	6,67	6,67	46,67	93,33
7	0,00	0,00	0,00	3,33	86,67	93,33	86,21	NR
8	0,00	0,00	10,34	53,33	0,00	0,00	55,17	100,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	0,00	10,00	16,67
10	0,00	53,33	0,00	13,33	0,00	0,00	3,33	20,00
11	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67	13,33	10,34
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,90	3,45
13	0,00	20,00	36,67	93,33	0,00	0,00	53,33	76,67

\*Mat.: maternidade, Cresc.: crescimento, Term.: terminação



**Figura 1.** Porcentagem de animais em terminação positivos pelo teste de ELISA (Ponto de Corte=0,549) e/ou pela PCR em função do IPP da granja