

# Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*: considerações sobre diferentes opções de cuidados

Neste documento, é apresentada uma visão geral dos métodos mais comuns para a exposição ou detecção do patógeno *M. hyo*, juntamente com as vantagens e limitações mais significativas para cada um deles.

## Maria Pieters, DVM, PhD

Departamento de Medicina Veterinária de Rebanho e Laboratório de Diagnóstico Veterinário. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Minnesota

Independentemente da localização geográfica, tamanho ou sistema de produção, os rebanhos podem ser infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), o que causa grandes problemas respiratórios em suínos.

Uma doença crônica por natureza, a infecção por esta bactéria pode permanecer no trato respiratório dos suínos por um longo período (muitas vezes mais de 7 meses). A persistência de *M. hyo* é muito influente em sua epidemiologia e determina principalmente o desenho de medidas de controle da doença. Igualmente importante, porém, é o fato de que as infecções por *M. hyo* são consideradas como portas de entrada para outros agentes virais e bacterianos nos pulmões dos suínos.

Prevenção, tratamento, controle e erradicação da doença são altamente dependentes do diagnóstico, pois o diagnóstico permite avaliar a eficácia e o sucesso de tais medidas.

## Outros agentes virais e bacterianos nos pulmões dos suínos

Infecções polimicrobianas, como o Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC), que envolve o *M. hyo* juntamente com agentes como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), vírus influenza A ou circovírus suíno tipo 2, são frequentemente observadas no campo.

Além disso, agentes bacterianos como *Pasteurella multocida*, por exemplo, são comuns em infecções por *M. hyo*.



Sergey Nivens/shutterstock.com

**O *M. hyo* continua sendo um patógeno significativo, que afeta suínos em todo o mundo.**

## Diagnóstico de *M. hyo*

No caso das infecções por *M. hyo*, abordagens diagnósticas sólidas para apoiar o controle da doença tem sido dificultadas pela falta de técnicas e métodos para isolar ou detectar o patógeno, seja em laboratório ou em modelos clínicos.

## Isolamento bacteriano

Historicamente conhecido como o padrão ouro para detecção de *M. hyo*, o isolamento bacteriano é um dos métodos menos empregados para tal. Assim, o status do padrão ouro é mais teórico do que prático. Vários fatores são responsáveis pela falta de uso deste método, tais como:

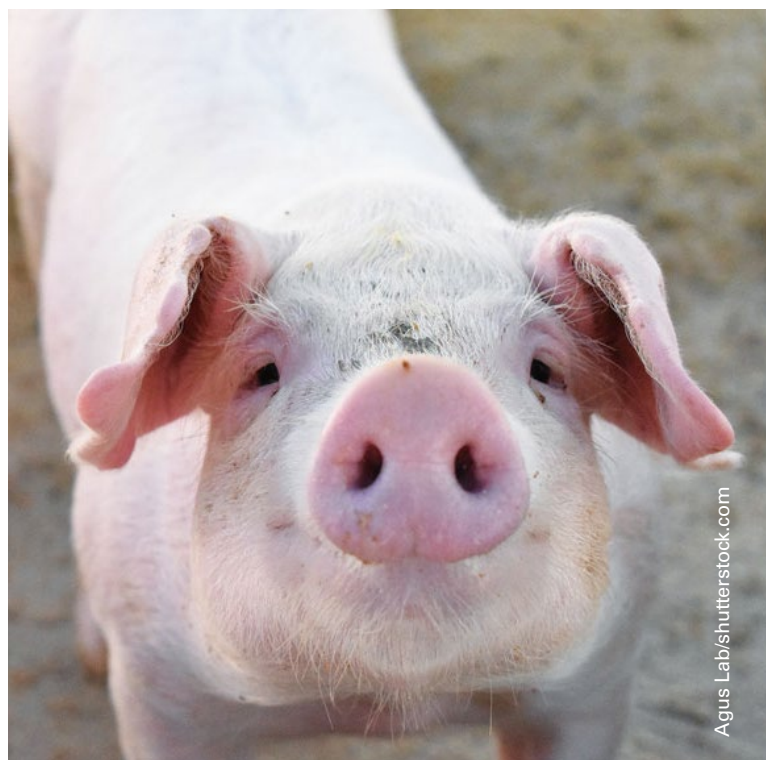
1

### Tamanho pequeno

Os mycoplasmas são agentes bacterianos caracterizados por um tamanho muito pequeno, que pode ser aproximadamente dez vezes menor do que as bactérias comuns.

Portanto, historicamente, os mycoplasmas eram considerados como vírus, pois eram facilmente filtrados em laboratório.

Essa característica levou à falhas na detecção por muitos anos.



Agus Lab/shutterstock.com

2

### Taxa de replicação lenta

Enquanto certos agentes bacterianos podem se replicar tão rápido quanto a cada 20 minutos e produzir novas colônias, *M. hyo* pode levar mais de 6 horas para produzir células filhas.

Obviamente, a *M. hyo* não é a bactéria de crescimento mais lento já conhecida, mas essa característica torna muito demorado obter um número crítico de colônias a serem mais facilmente evidenciadas no meio de cultivo.

O isolamento bacteriano bem sucedido de *M. hyo* leva muito tempo, quando comparado com outras bactérias. Por exemplo, pode levar várias semanas e, às vezes, até meses para a *M. hyo* crescer fortemente em laboratório, enquanto as colônias *Escherichia coli* podem ser visíveis em poucos dias.

3

### Crescimento excessivo de outros agentes e altos requisitos para crescimento

Outra complicação criada pelo tempo de geração extremamente lento de *M. hyo* é que outros agentes (principalmente bacterianos, mas também fúngicos) poderiam estar presentes no modelo clínico e se beneficiarão do meio extremamente rico, o que lhes permite prosperar nesse meio tempo.

Esta questão não só produz contaminação e crescimento excessivo de outros agentes, mas também pode tomar a maioria dos fatores nutricionais do meio, que a *M. hyo* precisaria para o seu crescimento.

Na maioria dos casos, a *Mycoplasma hyorhinis* (uma espécie de mycoplasma suíno que pode ser uma bactéria comensal presente nos pulmões dos suínos) supera a *M. hyo* e, como resultado, é particularmente difícil separar e diferenciar as duas bactérias na mesma amostra.

No entanto, foi relatado que a adição de um certo agente antimicrobiano ao meio de *M. hyo* ajudou a suprimir o crescimento de *M. hyorhinis* e, portanto, permitiu maior recuperação dos isolados de *M. hyo*.

**O isolamento bacteriano é conhecido como padrão ouro para a detecção de *M. hyo*, mas hoje é um dos métodos menos empregados para tal finalidade devido a vários fatores complicadores.**

Aproximadamente dez anos após sua primeira identificação e caracterização, foi desenvolvido um meio de cultura para crescimento de *M. hyo*. Hoje, mais de quatro décadas depois, a mesma receita para o meio ainda é usada em laboratórios de pesquisa em todo o mundo. No entanto, investigações mais recentes tem:

- Comparado o crescimento laboratorial de várias espécies de *Mycoplasma* suíno.
- Analisado requisitos moleculares.
- Sugerido que receitas revisadas para preparação do meio de cultivo podem ser desenvolvidas.

Enquanto isso, nenhuma outra receita para esse meio parece estar disponível publicamente. Independentemente das limitações e dificuldades de crescimento de *M. hyo* em laboratório, o sucesso pode ser alcançado e os isolados podem ser obtidos.

### Detecção por ELISA

Por muitos anos, a detecção da exposição ao *M. hyo* tem sido praticada nos suínos a partir da mensuração de anticorpos sistêmicos através do ensaio imunossorvente ligado à enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

Anticorpos para *M. hyo*:

1

### Geralmente são desenvolvidos no hospedeiro após um período variável de tempo

Provavelmente como um resultado da dose infecciosa ou da rota da infecção, ou dependendo do tipo de exposição (natural, artificial, passiva ou ativa), anticorpos foram detectados tão cedo quanto aproximadamente 2 semanas (embora raramente) ou tão tarde quanto meses após a exposição.

Na realidade, os fatores e condições específicos que impulsionam o tempo da resposta imune humoral a *M. hyo* não foram descritos em grande detalhe. Assim, indicar o tempo específico de exposição ao patógeno com base na detecção de anticorpos sistêmicos pode ser enganoso.

2

### Não se conservam por toda a vida dos suínos (nem mesmo em suínos em crescimento)

Os anticorpos diminuem após vários meses pós-exposição e podem ser indetectáveis com os testes ELISA.

## M. hyo no laboratório

Vários laboratórios de pesquisa ao redor do mundo possuem acervos desse patógeno. Nos laboratórios de diagnóstico de rotina, um isolado bacteriano *M. hyo* é particularmente necessário, entre outras razões, para:

- Desenvolvimento de testes de sensibilidade antimicrobiana.
- O uso em produtos vacinais específicos do rebanho (como bacterinas autógenas).

As razões acima mencionadas são muito diferentes da simples detecção. Assim, deve-se deixar claro que os laboratórios de diagnóstico de rotina podem não empregar o isolamento bacteriano de *M. hyo* regularmente, mas podem ter situações específicas em que possam tentar. Apesar disso, o isolamento bacteriano de *M. hyo* para fins de pesquisa é mais comum, apesar da baixa taxa de sucesso.

## Detecção de anticorpos contra M. hyo por ELISA

Na era pré-PCR, a detecção de anticorpos específicos para *M. hyo* foi altamente empregada e talvez um dos métodos mais confiáveis para mostrar a exposição à bactéria na época, especialmente levando em consideração as inúmeras limitações do isolamento bacteriano.

Vários kits comerciais foram desenvolvidos e estão disponíveis na maioria dos países para detectar anticorpos para *M. hyo*. Basicamente, dois tipos de testes estão disponíveis:

- Ensaio ELISA indiretos baseados em preparações celulares inteiras.
- ELISA de bloqueio utilizando uma proteína específica.

Foram relatadas diferenças na detecção de anticorpos dos vários ensaios de *M. hyo*. No entanto, as diferenças parecem ser numéricas na maioria dos casos.



patarapong saraboon/shutterstock.com

Por todas essas razões, a detecção (ou ausência de detecção) de anticorpos contra *M. hyo* precisa ser cuidadosamente interpretada. Sabendo que infecções precoces podem ser perdidas com os testes ELISA, é crucial ter em mente que os programas de vigilância devem contar com vários ou diferentes exames.

Dado o fato de que os testes ELISA atuais para *M. hyo* detectam anticorpos sem diferenciar sua origem, um resultado positivo pode ser obtido após uma infecção ou um evento de vacinação. A vacinação com bactérias *M. hyo* gerará uma resposta imune sistêmica que será detectável pelos testes ELISA.

A diferença nas respostas do hospedeiro pós vacinação *M. hyo* (mesmo quando se aplica o mesmo produto comercial) é mais um componente da resposta altamente complexa dos suínos ao *M. hyo*. Esta resposta pode ser aparente após a exposição, mas não parece conferir um nível específico de proteção contra infecção, pois nenhuma correlação entre anticorpos e proteção foi demonstrada.

### Detecção de material genético de *M. hyo* por PCR

Os testes de detecção baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) são hoje os ensaios mais empregados para detecção de *M. hyo* em modelos clínicos e em amostras de laboratório. Com base na amplificação do DNA, os ensaios de PCR têm mostrado alta precisão de detecção, ou seja, alta sensibilidade e alta especificidade:

- A sensibilidade é dada pelo fato de que quantidades muito pequenas de DNA bacteriano podem ser detectadas na amostra.
- A especificidade baseia-se na premissa de que o DNA de outras espécies bacterianas, incluindo micoplasmas suínos muito próximos, não é amplificado.

Desde o PCR convencional, o *nested* e o *em tempo real*, variações do teste foram desenvolvidas desde o início dos anos 2000 e são utilizadas na maioria dos laborat



Vit Kovalcik/shutterstock.com

**A vacinação com bacterinas de *M. hyo* gerará uma resposta imune sistêmica que será detectável pelos testes ELISA na maioria dos casos.**

### Tenha cuidado

Assim, os profissionais devem ter cuidado para que não se façam suposições baseadas apenas nos resultados ELISA, nem mesmo diante dos altos níveis de anticorpos. Parece que diferentes produtos vacinais provocam graus altamente variáveis de resposta de anticorpos, independentemente de empregar um número semelhante de imunizações ou, em alguns casos, uma cepa bacteriana semelhante.

Explicações potenciais para essas diferenças podem ser baseadas nas características intrínsecas de cada vacina, na concentração de antígeno no produto, ou no adjuvante específico em cada formulação comercial.

rios veterinários de diagnóstico. No entanto, apesar da alta precisão dos testes de PCR, vários elementos precisam ser cuidadosamente considerados ao usar testes de PCR para diagnósticos de *M. hyo*.

O ponto de partida para testes de PCR – como acontece com outros tipos de testes, é claro – é uma boa amostra. Os fluidos orais, os cotonetes nasais, laringeos e traqueais profundos são os tipos de amostra mais comuns para detecção de *M. hyo* por PCR (figura).

É preciso mencionar, porém, que a limitação mais importante dos testes de PCR é o fato de que a detecção de material genético não implica que o patógeno esteja intacto e infeccioso. Assim, a contaminação com fontes de material genético da bactéria precisa ser considerada e cuidadosamente avaliada.

Além disso, permanece impossível prever a viabilidade do patógeno em amostras consideradas positivas apenas por PCR para *M. hyo*. Isso é particularmente importante depois que os tratamentos antimicrobianos foram aplicados aos suínos e os resultados positivos por PCR ainda são obtidos.

**As amostragens *in vivo* têm a vantagem de que o suíno pode ser amostrado de forma relativamente não invasiva (cotonetes) e um grau conveniente de sensibilidade pode ser alcançado.**

## Tipos de amostra

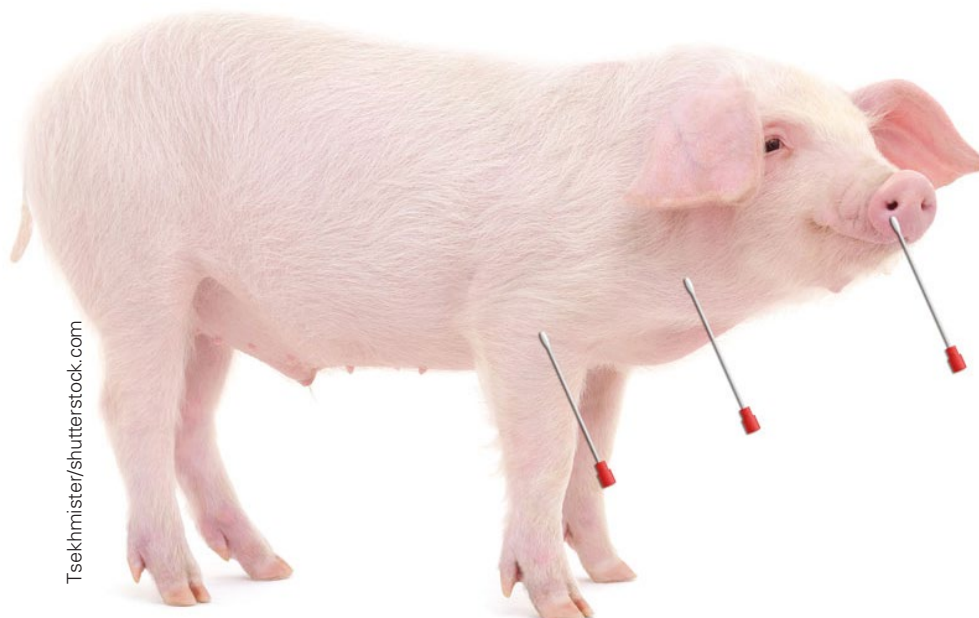
Especificamente para o PCR de *M. hyo*, o tipo de amostra que é processada fará uma diferença substancial no potencial de obter um resultado positivo, mesmo em um suíno infectado.

Sendo um patógeno respiratório, comumente considerado altamente restrito ao trato respiratório dos suínos, amostras de locais sistêmicos raramente são utilizadas para detecção desta bactéria.

Uma infinidade de tipos de amostras tem sido usada ao longo dos anos na tentativa de alcançar a maior sensibilidade possível para este patógeno. Amostras para testes de PCR podem ser coletadas em suínos vivos, bem como pós-morte.

As amostragens *in vivo* têm a vantagem de que o suíno pode ser amostrado de forma relativamente não invasiva e um bom grau de sensibilidade pode ser alcançado. No entanto, é convencional entender que amostras obtidas do trato respiratório inferior (como cotonetes brônquicos), onde o patógeno reside no suíno, são as mais sensíveis para detecção com PCR. A desvantagem dos cotonetes brônquicos é que a coleta de amostras só ocorre em suínos não-vivos.

Cotonetes nasais, laríngeos e traqueais profundos são comumente empregados para teste PCR de *M. hyo*. O nível de detecção em cada uma das amostras acima mencionadas parece ser diretamente proporcional à sua profundidade no trato respiratório. Em outras palavras, amostras obtidas da boca (incluindo seus fluidos) ou da cavidade nasal são menos sensíveis para a detecção de *M. hyo* do que amostras obtidas do trato respiratório inferior, como as coletadas na traqueia ou brônquios.



Tsekhmister/shutterstock.com

Fonte: adaptado de Maria Pieters.

A amostragem *in vivo* para detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* pode render resultados muito diferentes com base no tipo de amostra no mesmo indivíduo.

## Outros métodos menos comumente utilizados

A avaliação dos sinais clínicos que sugerem a infecção por *M. hyo*, como tosse seca, por exemplo, tem sido empregada para diagnóstico clínico de doença respiratória em geral. No entanto, devido à natureza não patogênica dos sinais, é impossível fazer um diagnóstico conclusivo apenas com base na apresentação clínica.

Da mesma forma, lesões pulmonares sugestivas de infecção por *M. hyo* são frequentemente avaliadas a fim de quantificar o grau de envolvimento da bactéria na patologia observada durante a necropsia.

Uma série de múltiplas opções com vantagens e limitações significativas complica o processo de tomada de decisão de médicos veterinários ao enfrentar infecções por *M. hyo*. Felizmente, nos últimos anos, foram observados vários estudos olhando amostras e comparações de métodos. Embora os resultados nem sempre sejam diretos, existem dados para mostrar o valor de cada ferramenta de diagnóstico da infecção em várias condições e cenários específicos.

Abordagens para o diagnóstico de *M. hyo* não parecem ser “de tamanho único que se adapta para todos os casos”. No entanto, amostrar o trato respiratório inferior

e testar via PCR é um protocolo comum que tem alta precisão. A comunicação frequente com um especialista em diagnósticos pode orientar os veterinários praticantes para as informações mais recentes que suportam os melhores métodos de diagnóstico.

**Amostrar o trato respiratório inferior e testar via PCR é um protocolo comum que tem alta precisão.**

### Lesões pulmonares

Lesões pulmonares causadas por infecções por *M. hyo* são características, mas assim como no caso de sinais clínicos, elas podem estar associados a outras patologias.

Assim, observações clínicas e lesões pulmonares podem ser sugestivas da presença de *M. hyo* no tecido, mas precisam ser confirmadas com outros exames antes de um diagnóstico ser estabelecido.



Sharaf Maksumov/shutterstock.com