

INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é um dos principais agentes causadores de pneumonias em suínos. A confirmação laboratorial é frequentemente realizada por histopatologia, imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR). Para as análises histológicas a conservação das amostras se dá através da fixação em solução formalina a 10%. Entretanto, essa forma de conservação pode interferir na PCR. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos de conservação de amostras de pulmão utilizando técnicas de biologia molecular, histologia e imuno-histoquímica como ferramentas diagnósticas auxiliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Em um frigorífico situado em Harmonia, Rio Grande do Sul, coletou-se fragmentos de 15 pulmões suínos com consolidação ântero-ventral, lesão macroscópica indicativa de infecção por *M. hyopneumoniae*. Dos brônquios e bronquíolos dos fragmentos coletou-se suabes, que foram mantidos refrigerados. Os fragmentos foram divididos em partes iguais. Uma parte foi congelada e a outra fixada por 24hs em formalina 10% e posteriormente processada e embecida em parafina. Obteve-se cortes histológicos das amostras embecidas em parafina para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), e para teste de imuno-histoquímica (IHQ) para *M. hyopneumoniae*. Para a IHQ utilizou-se o anticorpo específico anti-p36 na diluição de 1:200, de acordo com protocolo padrão do laboratório (dados não publicados). Extraiu-se DNA de todas as amostras através de kits comerciais Qiagen: para suabe e tecido congelado (Qiamp DNA mini kit), e para tecido embecido em parafina (Qiamp DNA FFPE Tissue kit). Foi realizado *nested*-PCR para *M. hyopneumoniae* de acordo com Thacker (2008). Os fragmentos amplificados (350 pb) foram separados eletroforicamente em gel de agarose 2% e corados com Blue Green (LCG biotecnologia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme apresentado na Tabela 1, 100% dos suabes e tecidos congelados foram positivos na PCR, demonstrando que essas formas de conservação não interferem na reação de PCR para o agente. Das amostras fixadas em formalina 10%, apenas 11 foram positivas na PCR. De acordo com estes resultados, a fixação em formalina a 10% e o processamento de amostras para a obtenção de blocos de parafina afetam negativamente a PCR. Histologicamente, a hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar (BALT), foi a alteração mais observada (11/15) e é indicativa de infecção por *M. hyopneumoniae* (Figura 1). Na análise por IHQ, 7 das 15 amostras apresentaram marcação positiva para *M. hyopneumoniae* (Figura 2), sendo que todas apresentavam hiperplasia de BALT. Comparando os resultados da PCR das amostras embecidas em parafina com os achados histológicos característicos da infecção por *M. hyopneumoniae*, observou-se uma concordância de resultados em 13 das 15 amostras analisadas (Tabela 1)

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a melhor alternativa de conservação de amostra para o teste de PCR é tecido refrigerado ou congelado, portanto o envio de amostras nessas condições favorecerá o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* por PCR. A escolha do tipo de conservação de amostra dependerá do teste laboratorial requerido e pode influenciar no resultado da PCR. Dependendo do tipo de amostra, pode-se diminuir a capacidade de detecção do agente por PCR, como observado em material conservado em formalina a 10% e embecido em parafina. O PCR foi mais sensível para a detecção do agente do que a IHQ e o HE. Sendo que, é sabido que nem todo o resultado positivo para a presença da *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos significa doença ativa. A técnica de *nested* PCR é capaz de detectar o agente em pulmões sem alterações histológicas.

Tabela 1: Resultados dos procedimentos realizados

Amostra	nested PCR			Histologia Hiperplasia de BALT	Imuno- hstoquímica (p36)
	Suabe Refrigerado	Tecido Congelado	Tecido em Parafina		
1	+	+	+	Acentuada	+
2	+	+	-	Ausente	-
3	+	+	+	Discreta	-
4	+	+	-	Ausente	-
5	+	+	-	Discreta	-
6	+	+	-	Ausente	-
7	+	+	+	Ausente	-
8	+	+	+	Moderada	+
9	+	+	+	Acentuada	-
10	+	+	+	Acentuada	+
11	+	+	+	Acentuada	+
12	+	+	+	Discreta	+
13	+	+	+	Moderada	-
14	+	+	+	Discreta	+
15	+	+	+	Acentuada	+

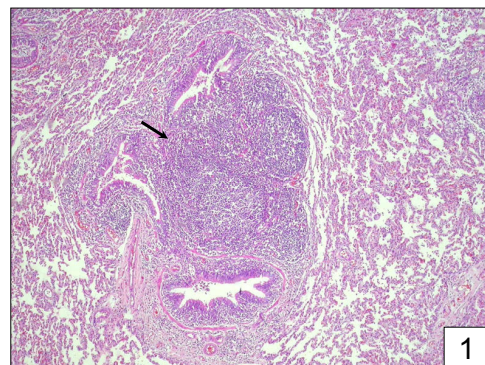


Figura 1: Pulmão, hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar (seta), HE. Obj. 4.

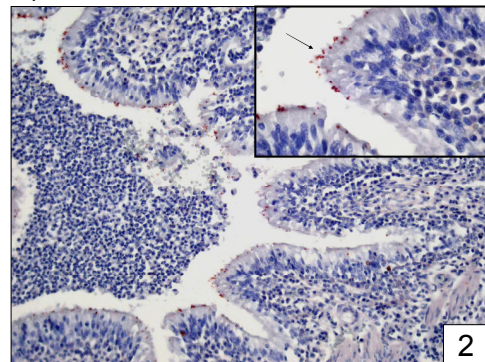


Figura 2: Pulmão, Imuno-histoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae*. Marcação nos cílios do epitélio bronquiolar (detalhe, Obj. 20). Método estreptavidina-biotina-peroxidase, cromógeno AEC. Contracorado com hematoxilina de Mayer. Obj. 10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007.
- MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, 1476p.
- SARRADEL, J. et al. *A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Pathol.* 40: 395 – 404, 2003.
- THACKER, E. L. et al. *Real-Time PCR Assays to Address Genetic Diversity Among Strains of Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug. 2008: 2491-2498. American Society for Microbiology.