

# Utilização de imuno-histoquímica para a detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* e de proliferação celular (Ki-67) em pulmões com lesões sugestivas de pneumonia enzoótica



Karine Ludwig Takeuti<sup>1,2</sup>, Tatiane Terumi Negrão Watanabe<sup>2</sup>, Veronica Machado Rolim<sup>2</sup>, Luiza Amaral de Castro<sup>1,2</sup>, David Driemeier<sup>2</sup> e Sérgio Ceroni da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular Aplicada, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>2</sup> Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil.

[www.ufrgs.br/favet/lbma](http://www.ufrgs.br/favet/lbma) - [lbma@ufrgs.br](mailto:lbma@ufrgs.br) [www.ufrgs.br/patologia](http://www.ufrgs.br/patologia) - [setpatvet@ufrgs.br](mailto:setpatvet@ufrgs.br)



## INTRODUÇÃO

A pneumonia enzoótica (PE), doença crônica infecciosa causada pela bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, acomete suínos de todas as idades. Clinicamente, os animais apresentam tosse seca e atraso de ganho de peso, o que causa grande perda econômica à suinocultura. O agente adere ao epitélio ciliado das vias respiratórias, multiplicando-se promove a destruição dos cílios e induz resposta inflamatória. Este trabalho teve como objetivo descrever o uso da técnica da imuno-histoquímica (IHQ) como método de diagnóstico de PE em pulmões de suínos com suspeita da doença, assim como identificar os principais locais com proliferação celular inflamatória reativa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e cinco amostras de pulmões de suínos, com lesões descritas como típicas de PE no exame histopatológico, foram submetidos à IHQ pelo método da estrepto-avidina-biotina-peroxidase por meio do kit LSAB Dual LINK HRP (DAKO®) para detecção de *M. hyopneumoniae*, com a utilização de anticorpo policlonal anti p-36 (diluição 1:200). A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato, pH 6,0 em microondas por 10 minutos seguidas de protease XIV (Sigma®) por 15 minutos. A revelação foi feita com 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC) e contra corados com Hematoxilina de Mayer. O anticorpo monoclonal Ki-67 (DAKO®, MIB-1, diluição 1:300) foi usado para evidenciar proliferação celular nos pulmões amostrados. A recuperação antigênica foi realizada através de tampão citrato, pH 6,0 em panela de pressão por 7 minutos, revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e contra corados com Azul de Alciano para evidenciar células caliciformes em brônquios e bronquíolos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microscopicamente, foram observados hiperplasia linfoide peribronquiolar (BALT) (91,4%), pneumonia intersticial (25,7%) e broncopneumonia purulenta (22,8%). Na IHQ 100% das amostras apresentaram marcação positiva para *M. hyopneumoniae* em cílios de brônquios e bronquíolos (Figura 1). Vinte e nove amostras (82,9%) apresentaram acentuada marcação para Ki-67 em regiões de hiperplasia de BALT e discreta marcação em epitélio de brônquios e bronquíolos, o que era acompanhado pela presença de células caliciformes (Figura 2). No entanto, em seis amostras (17,1%) houve uma marcação acentuada para Ki-67 em epitélio metaplásico bronquial e bronquiolar com diminuição de células caliciformes (Figura 3). Com os resultados obtidos é possível afirmar que as lesões sugestivas de PE ao exame histopatológico em hematoxilina e eosina (HE) foram compatíveis com a doença, visto que todas as amostras marcaram positivamente para o agente por meio da IHQ. Observou-se ainda que, quando havia baixa proliferação celular em epitélios de brônquios e bronquíolos (Ki-67), a diminuição de células caliciformes não ocorria, o que foi evidenciado pelo Azul de Alciano. Porém, quando havia acentuada marcação de Ki-67 nestas regiões, poucas células caliciformes eram encontradas.

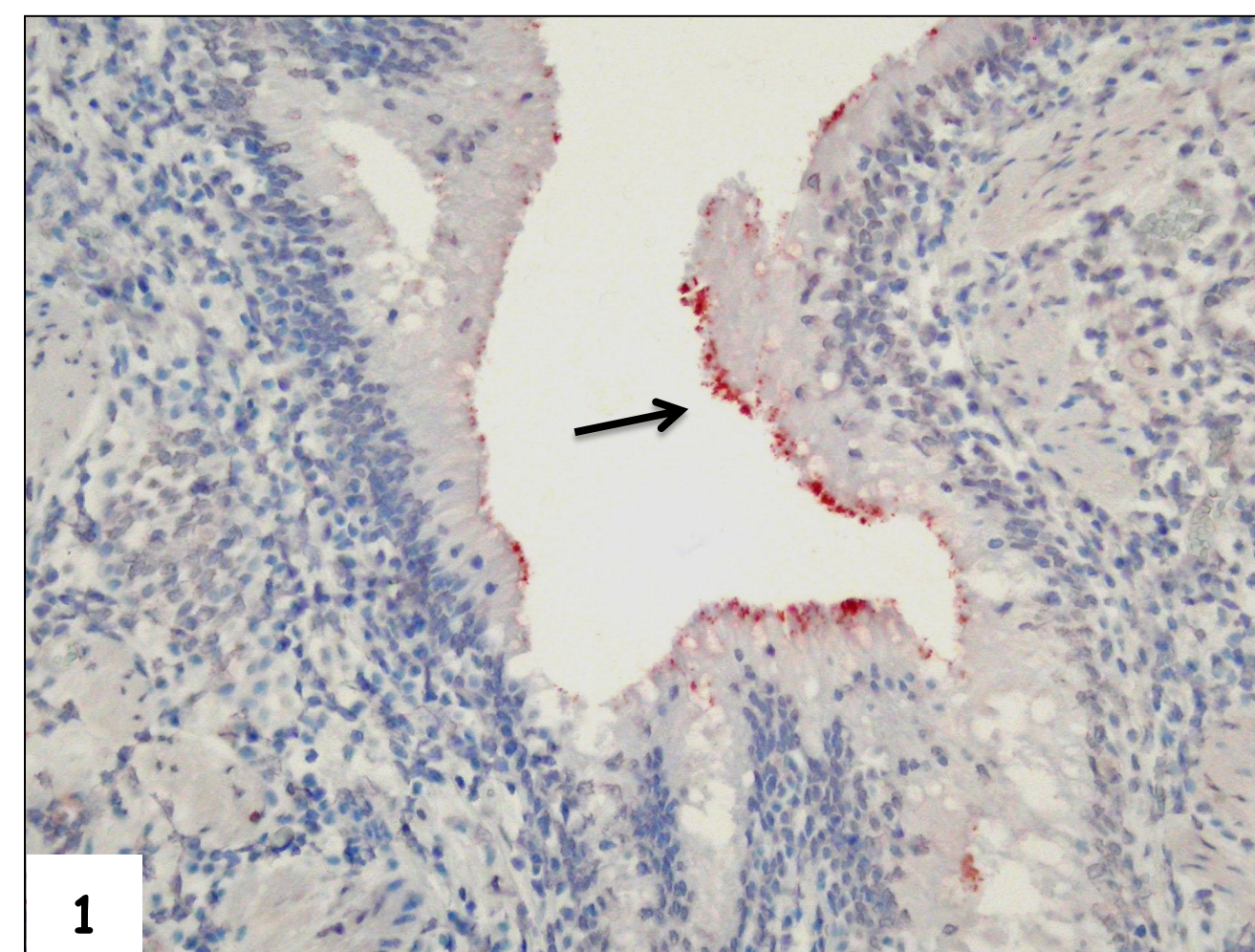


Figura 1. Pulmão, pneumonia enzoótica suína, imuno-histoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae* (anti-p36). Revelação com cromógeno AEC e contra coloração de Hematoxilina de Meyer. Intensa marcação positiva em cílios do epitélio bronquiolar (seta), (300x).

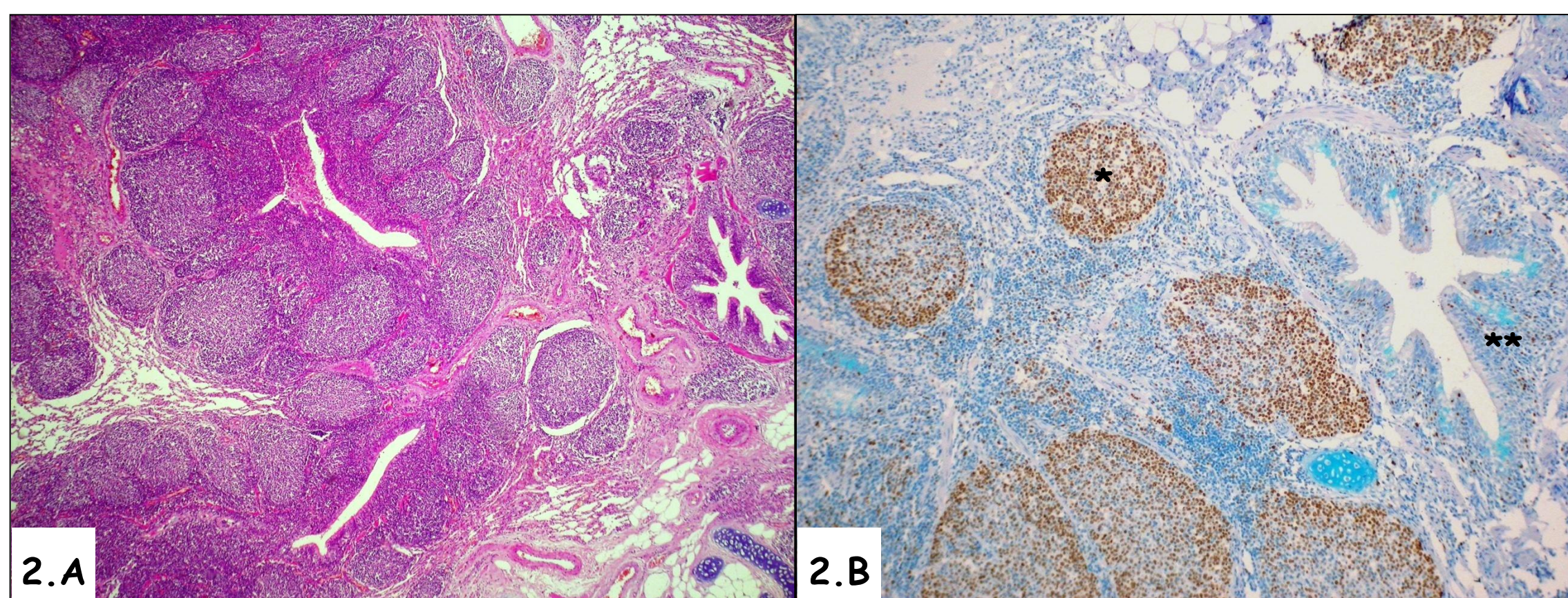


Figura 2. Pulmão, pneumonia enzoótica suína. A. Acentuada hiperplasia folicular peribronquial e peribronquiolar com estenose da luz (HE, 40x). B. Intensa marcação positiva nos folículos linfoides peribronquiolares (\*), com presença de células caliciformes em epitélio bronquiolar, evidenciadas pelo Azul de Alciano (\*\*). (IHQ anti-Ki-67, MIB-1, revelado com DAB e contra corado com Azul de Alciano, 100x).

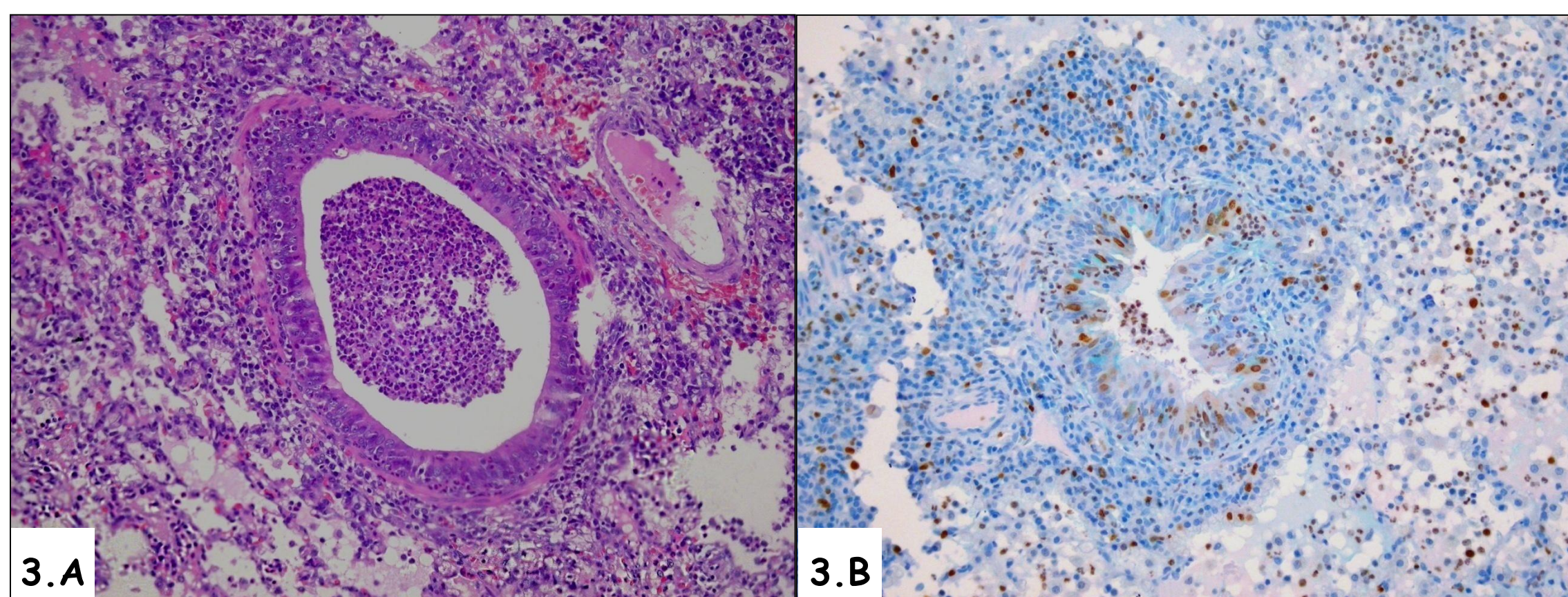


Figura 3. Pulmão, pneumonia enzoótica suína. A. Metaplasia de epitélio bronquiolar com exsudato purulento (HE, 200x). B. Marcação positiva nuclear em células epiteliais em bronquíolo com diminuição de células caliciformes (IHQ anti-Ki-67, MIB-1, revelado com DAB e contra corado com Azul de Alciano, 200x).

## CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que *M. hyopneumoniae* leva à diminuição da produção de muco e aumento das respostas proliferativas na mucosa e tecido linfoide pulmonar. A IHQ para *M. hyopneumoniae* é uma importante ferramenta de diagnóstico complementar à histopatologia, demonstrando ser um método eficaz e confiável. Desta forma, a detecção do agente infeccioso associado às lesões histopatológicas podem direcionar manejos sanitários específicos que permitam amenizar as perdas econômicas na suinocultura.

## REFERÊNCIAS

- ECCO, R.; LAZZARI, A. M.; GUEDES, R. M. C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 6, p. 461-468, 2009.
- LÓPEZ, A. Respiratory System. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. *Pathologic basis of veterinary disease*. Missouri: Mosby Elsevier, 2007, p. 537-538.
- NEUMANN, E. J.; RAMÍREZ, A.; SCHWARTZ, K. J. Diseases caused by bacteria, mycoplasmas and spirochetes. In: \_\_\_\_\_. *Swine disease manual*. Iowa: American association of swine veterinarians, 2009, p. 29-30.
- REDONDO, E.; MASOT, A. J.; FERNÁNDEZ, A.; GÁZQUEZ, A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Path.*, v. 140, p. 260-270, 2009.
- SOBETIANSKY, J.; RISTOW, L. E.; MATOS, M. P. C.; BARCELLOS, D. Micoplasmoses. In: SOBETIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cênore Editorial, 2007, p. 15-169.