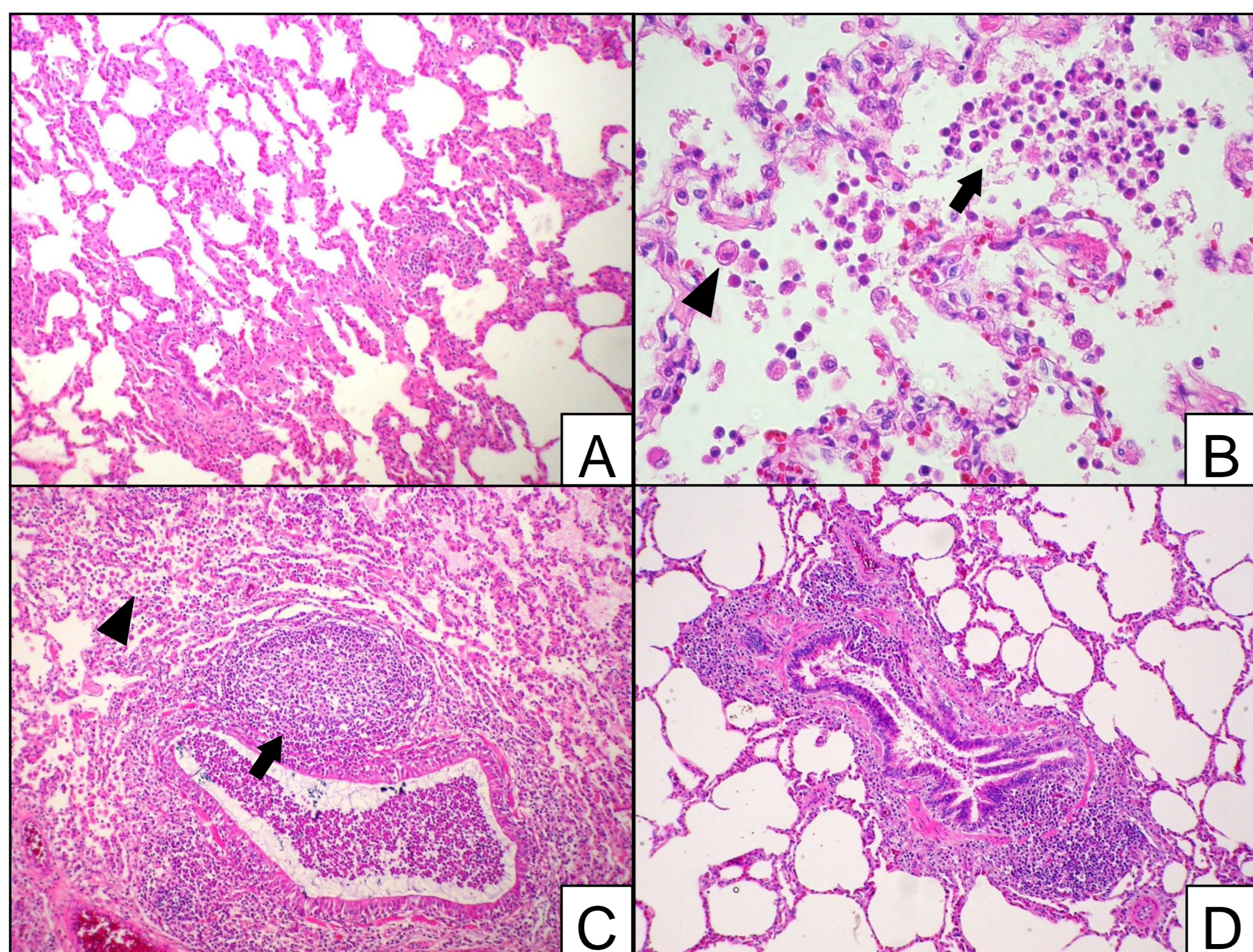


## INTRODUÇÃO

*Mycoplasma hyopneumoniae* é um importante patógeno em suínos, pois prejudica o sistema de defesa mucociliar, tornando-o suscetível a infecções pulmonares secundárias. Seu diagnóstico é realizado através da combinação de achados patológicos e detecção do agente. A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é um método de diagnóstico rápido e que permite quantificar o microrganismo, enquanto a análise histológica permite classificar a severidade e cronicidade das lesões a ele atribuídas. O propósito deste estudo é relacionar a carga infecciosa, obtida pela PCR em tempo real para *M. hyopneumoniae* em amostras de suabe bronquial, tecido pulmonar refrigerado e tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFEP) com a intensidade e cronicidade das lesões histológicas encontradas.

## MATERIAL E MÉTODOS

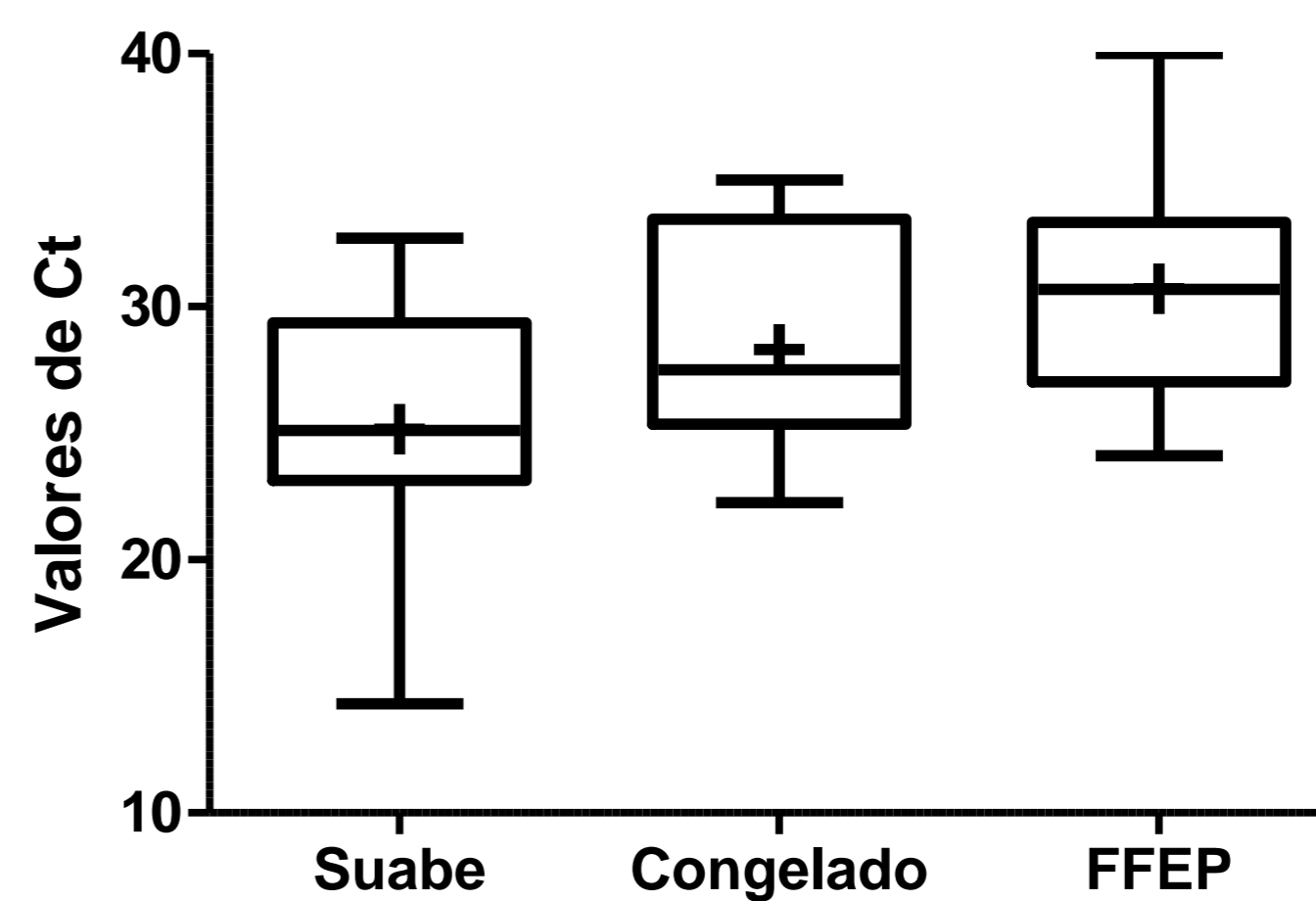
Para tanto, 15 fragmentos de pulmões suínos com consolidação crânio-ventral colhidos em abatedouro foram submetidos aos três métodos de conservação anteriormente citados (suabe refrigerado, tecido congelado e tecido FFEP). O DNA das amostras foi extraído, quantificado e submetido à PCR em tempo real para *M. hyopneumoniae*. As amostras passaram por exame histológico, e lhes foi atribuído um escore de 1 a 4 de acordo com as lesões, com base em outros estudos (Calsamiglia et al. 2000, Morris et al. 1995), conforme apresentado na **Figura 1**.



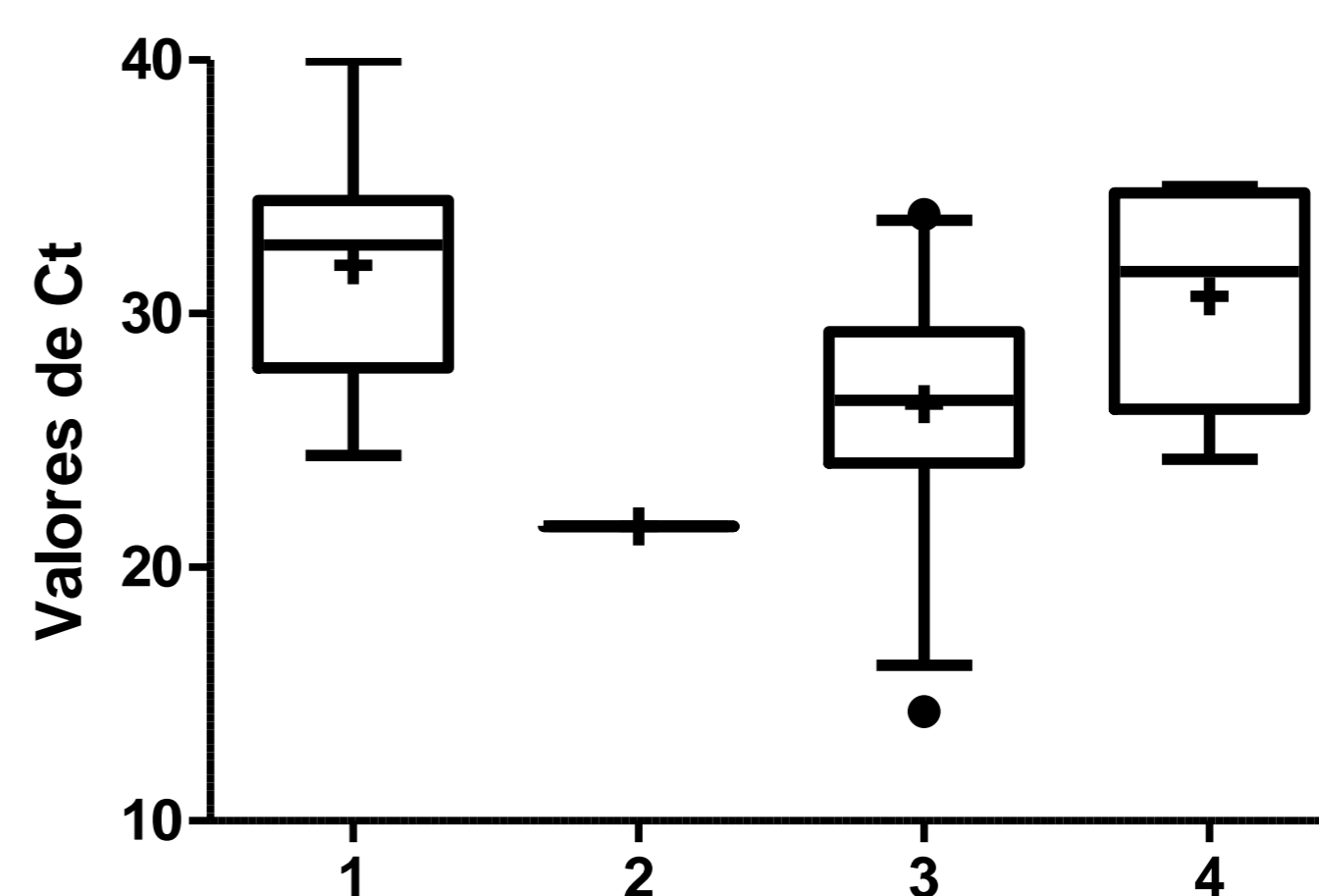
**Figura 1.** Pulmões suínos apresentando diferentes graus de lesão histopatológica. (A) pulmão classificado como grau 1, com espessamento discreto de septos, incompatível com infecção por *M. hyopneumoniae*, HE, Obj. 10x. (B) pulmão com características de grau 2, neutrófilos (seta) e macrófagos (ponta de seta) nos alvéolos, HE, Obj.40x. (C) Grau 3, hiperplasia de BALT (seta) e infiltrado misto no interior de alvéolos (ponta de seta), HE, Obj. 10x. (D) Grau 4, somente hiperplasia de BALT, HE, Obj. 20x.

## RESULTADOS

Todas as amostras não fixadas em formalina foram positivas, enquanto que das amostras FFEP, 14 de 15 foram positivas. As amostras de suabe e tecido refrigerado apresentaram valor de *Cycle Threshold* (Ct) médio de 25,1 e 28,3, respectivamente, significando maior quantidade de DNA-alvo que nas amostras FFEP, cujo valor de Ct médio foi de 30,7 (**Gráfico 1**). Somente uma amostra foi classificada como grau 2. Os menores valores de Ct, dentro de cada tipo de amostra, foram apresentados nos casos histologicamente classificados em 2 e 3 (**Gráfico 2**).



**Gráfico 1.** Distribuição dos valores de Ct para os diferentes tipos de amostra.



**Gráfico 2.** Distribuição dos valores de Ct de todas as amostras de acordo com o grau de lesão histológica.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a técnica de PCR em Tempo Real pode ser aplicada com sucesso a amostras de tecido FFPE. Entretanto, também foi observado que estas amostras apresentaram, em média, maiores valores de Ct (**Gráfico 1**), sugestivo de uma maior dificuldade na amplificação das mesmas. Amostras FFEP classificadas histologicamente como grau 1 (achados ausentes, inespecíficos ou discretos) e grau 4 (somente hiperplasia linfóide peribronquial (BALT)) apresentaram valores de Ct entre 30,6 e 34,6, enquanto as de grau 2 (achados compatíveis sem hiperplasia de BALT) e grau 3 (achados compatíveis e hiperplasia de BALT) exibiram valores de Ct entre 24,1 e 33,3. Esse padrão se repetiu em todos os tipos de amostra (**Gráfico 2**). É possível que as amostras classificadas como grau 1 sejam infecções iniciadas recentemente, em contraste, as lesões classificadas como grau 4 podem ser consideradas crônicas, não complicadas, com o agente em questão sendo eliminado. Ambas as classificações refletem estágios de infecção com poucas cópias do agente e que, por isso, apresentaram valores de Ct mais altos. Por outro lado, as infecções classificadas como graus 2 e 3 parecem ser aquelas em que o agente está em número maior e tendem a apresentar valores de Ct mais baixos.

## CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou que amostras FFEP possuem menos DNA-alvo do que amostras não fixadas em formalina; sugerindo que haja uma maior carga infecciosa em pulmões com mais lesões compatíveis e, que a hiperplasia de BALT seja uma lesão de caráter mais crônico em infecções por *M. hyopneumoniae* não complicadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. I. M. G. Respiratory system. In: Maxie, G. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Quinta edição. Guelph: Elsevier, v. II, 2006. p. 579-650.
- CALSAMIGLIA, M. et al. *Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of Mycoplasma hyopneumoniae in bronchial swabs by PCR*. *Veterinary Microbiology*. Jun., 2000. n. 76: 299-303.
- MORRIS, C. R. et al. *Seroepidemiologic study of natural transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in a swine herd*. *Preventive Veterinary Medicine*. Mar. 1995. n. 21: 323-337.
- THACKER, E. L. et al. *Real-Time PCR Assays to Address Genetic Diversity Among Strains of Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. Ago. 2008: 2491-2498. American Society for Microbiology.