

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**.

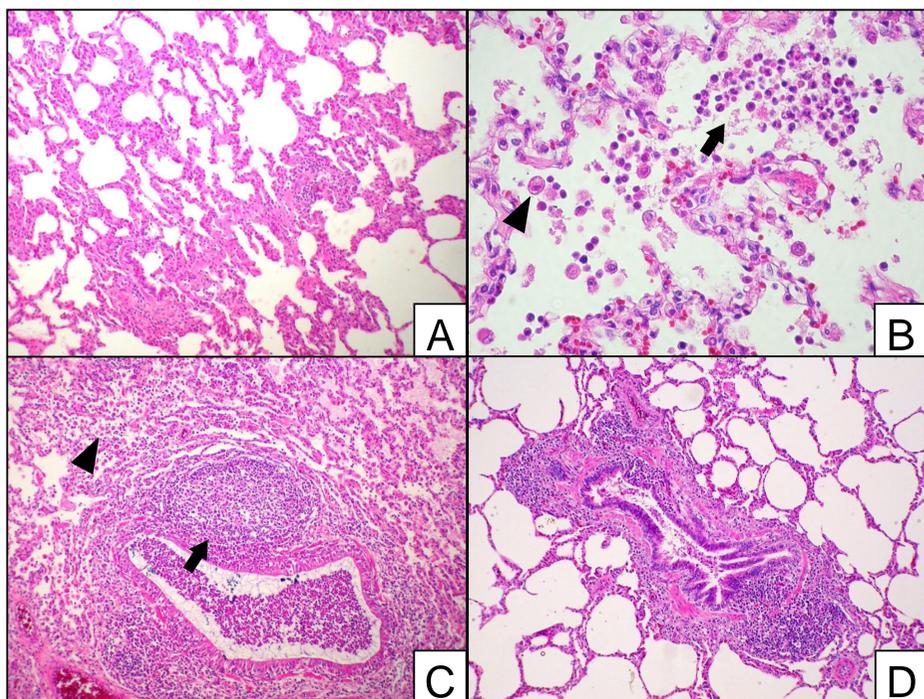


Figura 1. Pulmões suínos apresentando diferentes graus de lesão histopatológica. (A) pulmão classificado como grau 1, com espessamento discreto de septos, incompatível com infecção por *M. hyopneumoniae*, HE, Obj. 10x. (B) pulmão com características de grau 2, neutrófilos (seta) e macrófagos (ponta de 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**).

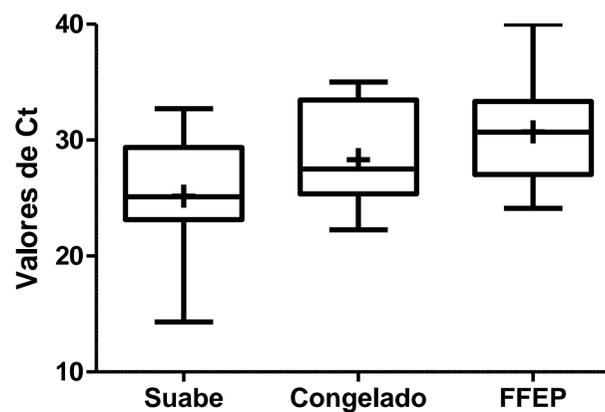


Gráfico 1. Distribuição dos valores de Ct para os diferentes tipos de amostra.

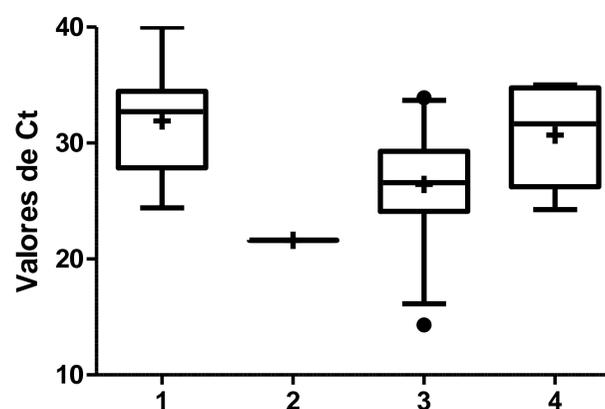


Gráfico 2. Distribuição dos valores de Ct de todas as amostras de acordo com o grau de lesão histológica.

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.