



LOCALIZAÇÃO DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* EM LESÕES PULMONARES DE SUÍNOS POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

MARCOS A.Z. MORÉS^{1*}, JOÃO X. DE OLIVEIRA FILHO², RAQUEL REBELATTO¹, CÁTIA S. KLEIN¹, NELSON MORÉS¹

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves – Concórdia SC – marcos.mores@embrapa.br; ² Centro de Diagnóstico em Sanidade Animal – CEDISA – Concórdia SC.

Resumo – Com o objetivo de estudar a sensibilidade e especificidade da técnica de FISH em detectar *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) em lesões pneumônicas com diferentes características em suínos, foram analisadas 60 amostras de pulmões. Os resultados foram comparados com o isolamento bacteriano. A técnica de FISH apresentou boa sensibilidade e especificidade em lesões pulmonares agudas caracterizadas por pleuropneumonia fibrinosa ou fibrinonecrótica, porém foi pouco sensível em broncopneumonias crônicas. Com a técnica de FISH foi possível identificar a localização da *P. multocida* nas diferentes lesões, permitindo melhor entendimento da patogenia da infecção.

Palavras-chave: Pneumonia; *Pasteurella multocida*; suínos.

PASTEURELLA MULTOCIDA LOCATION IN LUNG LESIONS OF PIGS BY FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

Abstract - In order to study the sensitivity and specificity of FISH to detect *Pasteurella multocida* on pneumonic lesions with different characteristics in pigs, 60 samples of pig lungs were analyzed. The results were compared with bacterial isolation. FISH presented good sensitivity and specificity in acute lung lesions characterized by fibrinous or fibrinonecrotic pleuropneumonia, but was less sensitive in chronic bronchopneumonia. FISH enabled to identify and locate *P. multocida* in pulmonary lesions, allowing a better understanding about the pathogenesis of the infection.

Keywords - Pneumonia; *Pasteurella multocida*; swine.

Introdução – As pneumonias estão entre as principais causas sanitárias responsáveis por perdas econômicas na suinocultura, aumentando a mortalidade e causando prejuízos nos índices zootécnicos e condenações de carcaças nos frigoríficos. *P. multocida* é um dos principais agentes infecciosos encontrados em lesões pneumônicas em suínos (OPRIESSNIG et al., 2011), normalmente associada à outras infecções ou como agente primário (OLIVEIRA FILHO, 2014). A técnica de FISH permite a localização específica de agentes infecciosos nos tecidos, fornecendo informações úteis da distribuição e importância dos agentes nas lesões. O objetivo deste trabalho foi avaliar a localização da *P. multocida* nas lesões pneumônicas em suínos e avaliar sua sensibilidade na comparação com o isolamento bacteriano.

Material e Métodos – Foram analisadas 60 amostras de pulmões de suínos de terminação colhidas de animais com sinais clínicos respiratórios, as quais apresentavam diferentes tipos de lesões pneumônicas. Porções adjacentes das lesões foram colhidas refrigeradas para isolamento bacteriano e em formol 10% para histopatologia e FISH. Após a fixação por 48 a 72 horas os tecidos foram desidratados, clarificados e emblocados em parafina conforme técnicas de rotina. O isolamento e a identificação bacteriana foram realizados conforme Quinn et al. (2011). Para a detecção de *P. multocida* pela técnica de FISH utilizou-se uma sonda específica para a porção 16SrRNA de *P. multocida* com a sequência 5'-CTATTTAACAACATCCCTTC-3', marcada com Cy3, e procedimentos conforme PORS et al., 2011. Resumidamente, a hibridização foi realizada em câmaras de hibridização com as lâminas montadas em *coverplates* e incubadas com 100 ml de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7.2, 0.9 M NaCl, 0.1% de dodecila sulfato de sódio) e 500 ng de sonda a 37°C por 16 horas. Posteriormente, realizou-se três lavagens com solução tampão de hibridização pré-aquecida (37°C) e, em seguida, mais três com tampão de lavagem (37°C) (100 mM Tris, pH 7.2, 0.9 M NaCl). As preparações foram desmontadas e as lâminas secas em estufa 37°C. Todo o



procedimento foi realizado sem a incidência de luz direta. As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência (*Observer V1- Zeiss*) com filtro para fluorocromo Cy3 e objetiva de 40x e 100x.

Resultados e Discussão – Das 60 amostras analisadas, 33 apresentaram crescimento de *P.multocida* pelo método de isolamento bacteriano e somente 6 amostras foram positivas na técnica de FISH. Todas as amostras positivas pelo FISH foram positivas também no isolamento bacteriano. Ao analisarmos os resultados frente aos diferentes tipos de lesões pneumônicas, broncopneumonias fibrinosas ou fibrino-necróticas agudas os dois métodos detectaram *P.multocida* nas 3 amostras analisadas que apresentaram este tipo de lesão. Em 57 amostras com lesões de broncopneumonias crônicas, associadas ou não com pneumonia intersticial e pleurite crônica, 30 foram positivas no isolamento bacteriano e apenas 3 pela técnica de FISH. Estes resultados demonstram que a técnica de FISH, quando comparada com o isolamento bacteriano, apresenta boa especificidade e baixa sensibilidade, sendo útil para a localização da *P.multocida*, principalmente em lesões graves agudas de broncopneumonia ou pleuropneumonia fibrinossupurativa ou fibrinonecrótica. Cabe salientar que o método de FISH indica a presença de rRNA da bactéria, sendo portanto dependente do estado funcional deste agente. O isolamento bacteriano é um método mais sensível para demonstrar a microbiota bacteriana dos tecidos, porém não fornece informações sobre sua distribuição e conseqüentemente sua importância na indução das lesões. No exsudato fibrinossupurativo sobre a pleura, *P.multocida* foi observada dispersa no exsudato e, em maior quantidade, no citoplasma de fagócitos. Já nas amostras com pneumonia fibrinonecrótica, *P.multocida* foi observada em grandes quantidades nas áreas de necrose de coagulação no parênquima alveolar, também com localização dispersa no tecido e principalmente, no citoplasma de fagócitos (Figura 1). Atualmente, sabe-se que no rebanho brasileiro circulam cepas de *P.multocida* que são secundárias a outras infecções e cepas consideradas primárias no desenvolvimento de lesões no pulmão, pleura e pericárdio (OLIVEIRA FILHO, 2014). Com isso a localização do agente em associação com as lesões é um passo importante na atribuição do seu papel etiológico. Nas 3 amostras com lesões de broncopneumonia supurativa positivas para *P.multocida* pela técnica de FISH houve leve marcação de bactérias livres na luz alveolar.

Conclusões – Conclui-se que a técnica de FISH é menos sensível que o isolamento bacteriano para detecção de *P.multocida* em amostras de lesões pulmonares caracterizadas como broncopneumonias crônicas, porém é um método específico e útil para a localização das bactérias, principalmente em pleurites fibrinossupurativas ou broncopneumonias fibrinonecróticas agudas.

Referências Bibliográficas

- OLIVEIRA FILHO J.X. 2014. **Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos**. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 124p.
- OPRIESSNIG T.; GIMENÉZ-LIROLA L.G. & HALBUR, P.G. 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews** 12:133-148.
- PORS, S.E.; HANSEN, M.S.; BISGAARD, M.; JENSEN, H.E., 2011. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, (150): 160 – 166.
- QUINN P.J., MARKEY B.K., LEONARD F.C. et al., 2011. *Pasteurella* species, *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi*, p.300-308. In: Ibid. (Eds), **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2nd ed. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa.

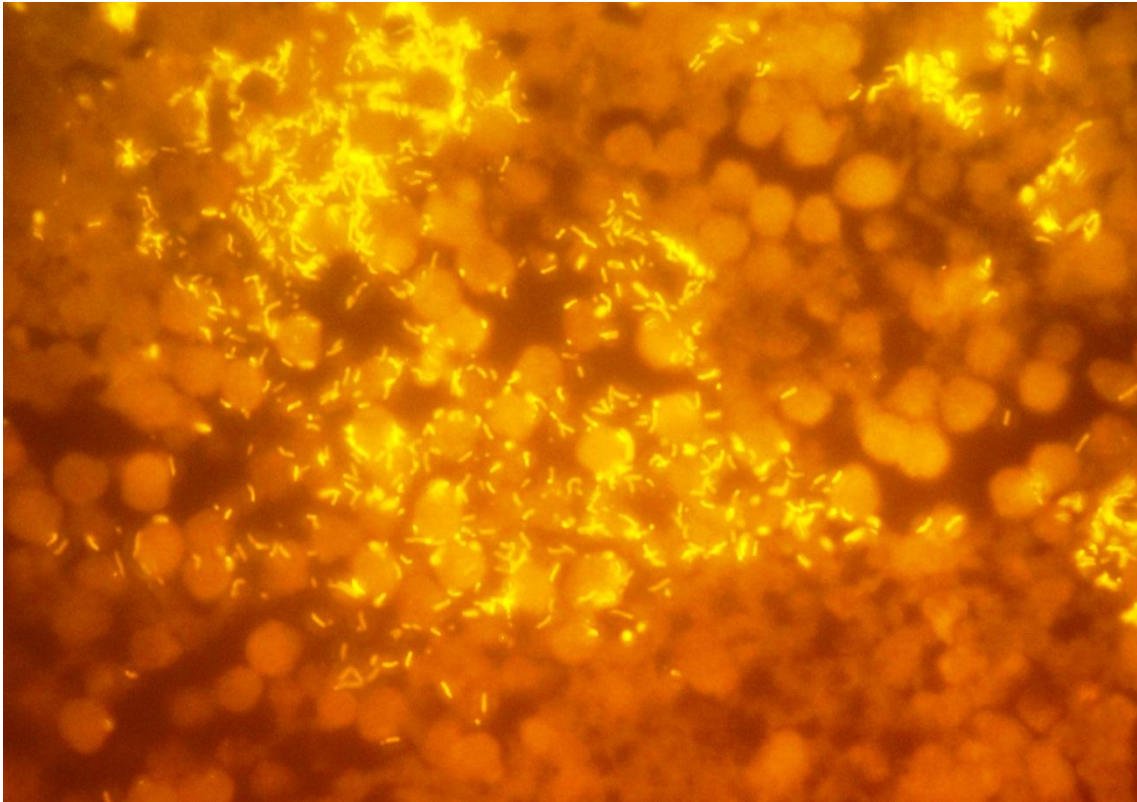


Figura 1 – Área de necrose de coagulação em pulmão de suíno. Marcação positiva de *P.multocida* por FISH. 400x.