

## PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA *Pasteurella multocida* EM AMOSTRAS DE PULMÃO DE SUÍNOS

Marilete Feruck<sup>1</sup>; Juliana Lazaroto<sup>2</sup>; Marcos A. Z. Morés<sup>3</sup>;  
João Xavier de Oliveira Filho<sup>4</sup> e Nelson Morés<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, e-mail: maari\_j@hotmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC / CAV), Lages, SC

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves

<sup>4</sup>Departamento de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

**Palavras-chave:** imuno-histoquímica, *pasteurella multocida*, suínos.

### INTRODUÇÃO

*Pasteurella multocida* é uma bactéria pertencente à família *Pasteurellaceae*, cocobacilo Gram-negativo e anaeróbio facultativo (5). É um dos principais agentes envolvidos em processos pneumônicos e pleurisias em suínos, além de participar da etiopatogenia da rinite atrófica progressiva em associação com *Bordetella bronchiseptica* (2). *P. multocida* é considerada agente secundário no “complexo de doenças respiratórias dos suínos” (CDRS), sendo comumente encontrada em lesões pulmonares (4), porém também podem atuar como agente primário ocasionando quadro de pneumonia/pleurite/pericardite (3). O diagnóstico presuntivo de pneumonia por *P. multocida* baseia-se na observação dos sinais clínicos (dispneia e febre) e alterações patológicas (broncopneumonia fibrinossupurativa associada ou não com pleurite e pericardite fibrinosa). Associado aos achados clínico-patológicos, o diagnóstico definitivo é obtido com detecção do agente por cultivo bacteriano e/ou testes moleculares (9). Além dessas técnicas, a imuno-histoquímica (IHQ) pode ser uma ferramenta importante no diagnóstico da doença, por ser um método que permite detectar o agente etiopatológico no local de infecção, em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina. Esse estudo teve como objetivo padronizar a técnica de IHQ para detecção de *P. multocida* para ser utilizada como ferramenta no diagnóstico de casos de pneumonia/pleurisia/pericardite em suínos.

### MATERIAIS E MÉTODOS

A padronização da IHQ para a marcação da *P. multocida* foi realizada pelo método de estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando-se um kit comercial (Kit LSAB<sup>®</sup> + System – HRP da DakoCytomation®). O anticorpo policlonal anti-*P. multocida* utilizado foi produzido *in house* em ovinos com um isolado de *P. multocida* estocado na Bacterioteca (Nº 11246) da Embrapa Suínos e Aves (8). Esse isolado foi obtido de um suíno de terminação com lesões acentuadas de pleuropneumonia fibrino-necro-supurativa, oriundo de granja de ciclo completo com surto grave de doença respiratória. Para a padronização da IHQ foram utilizados tecidos de pulmões de suínos SPF (*Specific Pathogens Free*) inoculados experimentalmente com o mesmo isolado utilizado na produção do soro hiperimune. A identidade do isolado foi confirmada como *P. multocida* tipo A por técnicas microbiológicas (6) e moleculares estabelecidas para a espécie (10). Inicialmente as amostras de pulmão foram fixadas em formol 10%, processadas rotineiramente, incluídas em parafina e os tecidos cortados com 3µm de espessura e fixados em lâminas tratadas com poly-L-lisina. Para o teste de IHQ os tecidos foram desparafinados e desidratados, e após submetidos aos seguintes passos: a) Recuperação antigênica pela associação de calor e ação enzimática: as lâminas foram submersas em tampão citrato e levadas ao micro-ondas por 5 min em potência de 700W (2X) e em seguida, os tecidos foram cobertos com a enzima pepsina 0,04%, incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C por 10 min.; b) Bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram submersas em peróxido de hidrogênio 3% por 5 min.; c) Anticorpo primário: foi aplicado sobre os cortes diluído em solução contendo PBS (Tampão Fostafo-Salino), BSA (*Bovine Serum Albumin*) e azida sódica, nas diluições de 1:250, 1:500, 1:800 e 1:1200 por 2 horas a 37°C; d) Anticorpo conjugado de ligação: os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 30 min a 37°C e lavados com solução PBS; e) Revelação da reação: adicionou-se o conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase por 30 min a 37 °C e a revelação foi realizada com 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) por 5 min a 37°C; f) A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por 2 min. Entre cada etapa, as lâminas foram enxaguadas por 5 minutos em solução PBS. Para verificar a especificidade da técnica foram utilizados tecidos positivos para os seguintes agentes: *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipos 3 e 5, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *P. multocida* tipo D. Além disso, realizou-se testes de

sensibilidade com tecidos inoculados com outras amostras de *P. multocida* tipo A isoladas de suínos com lesões respiratórias.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de IHQ utilizada mostrou-se eficaz na detecção de antígeno da *P. multocida* nos tecidos de suínos inoculados. O antígeno foi localizado principalmente no citoplasma de células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) e livres no parênquima alveolar de áreas pulmonares necróticas e no exsudato fibrinosupurativo na pleura, o que demonstra a atuação do agente como causa de pneumonia e pleurite. Na determinação da diluição do anticorpo policlonal de ovino anti-*P. multocida* tipo A, a diluição de 1:800 apresentou os melhores resultados, mostrando marcação antigênica adequada sem a ocorrência de *background*. Outros estudos da técnica de IHQ para *P. multocida* utilizam anticorpo policlonal anti-*P. multocida* tipo A de coelho na diluição de 1:2000 (1,7) Na análise de especificidade para outros agentes bacterianos causadores de pneumonias em suínos não houve marcação de antígenos nos tecidos inoculados com *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, porém houve marcação positiva para *P. multocida* tipo D, demonstrando que o anticorpo utilizado não diferencia os tipos capsulares A e D. No teste de sensibilidade a técnica mostrou-se eficaz para a identificação de outras amostras de *P. multocida* isoladas de suínos com doença respiratória.

### CONCLUSÃO

A técnica de IHQ padronizada permitiu a marcação específica do antígeno de *P. multocida* em fragmentos de pulmão fixados em formol e incluídos em parafina.

### REFERÊNCIAS

1. DAGLEISH, M. P. et al. Characterization and Time Course of Pulmonary Lesions in Calves after Intratracheal Infection with *Pasteurella multocida* A:3. **Journal of Comparative Pathology**. Vol. 142, p. 157 -169, 2010.
2. HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E.M.; NIELSEN, O.L. An investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark, **Journal of Comparative Pathology** 2010.
3. KICH, J. D. ; MORES, N. ; TRIQUES, N. ; NOGUEIRA, M. G. ; LOCATELLI, C. ; KLEIN, C. S.; FELICIO, R. P. **A Pasteurella multocida tipo A atua como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos?** Comunicado Técnico n. 469, Embrapa Suínos e Aves Concórdia, p. 7 2007.
4. MORES, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 2006. Curitiba, Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná.
5. PIJOAN, C. Pneumonic pasteurellosis. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 9.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p.719-726.
6. QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R., 1998. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby-Year Book. 648 p. 1998.
7. ONO, M. et al, Immunohistopathologic Demonstration of Pleuropneumonia Associated with *Morganella morganii* in a Piglet. **Veterinary Pathology Online vol:** 38 p. 336–339, 2001.
8. SILVA, G. B.et. al, Produção de soro hiperimune para detecção de *Pasteurella multocida*. In: 6<sup>o</sup> JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E II SEMINÁRIO DE PESQUISA E EXTENSÃO DA UNC, 2012, Concórdia, **Anais da VI Jornada de Iniciação Científica (JINC) e do II Seminário Integrado de Pesquisa e Extensão da UnC (SIPEX)**, Concórdia, 25 de outubro de 2012. – Brasília, DF: Embrapa, p 20, 2012.
9. SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 768 p. 2007.
10. TOWNSEND, K.M., BOYCE, J.D., CHUNG, J.Y., FROST, A.J., ADLER, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. **J. Clin. Microbiol.** Vol: 39 (3), p. 924–929, 2001.