

## **AVALIAÇÃO DA COINFECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 COM *Mycoplasma hyopneumoniae* EM AMOSTRAS DE PULMÕES COLETADAS EM ABATEDOURO NA REGIÃO DA ZONA DA MATA MINEIRA**

*EVALUATION OF THE CO-INFECTION CAUSED BY SWINE CIRCOVIRUS 2 AND *Mycoplasma hyopneumoniae* IN LUNG SAMPLES OBTAINED FROM SLAUGHTERHOUSE IN THE MATA MINEIRA REGION, BRAZIL*

**J. E. BEZERRIL<sup>1\*</sup>, J. P. MACHADO<sup>1</sup>, F. M. F. DA SILVA<sup>1</sup>, L. H. S. BULOS<sup>1</sup>,  
M. I. V. VILORIA<sup>1</sup>, M. R. ALMEIDA<sup>1</sup>**

### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo pesquisar a associação do PCV2 e *M. Hyopneumoneae* em amostras de pulmão de suínos. 32 fragmentos de pulmões, sendo 16 com lesões macroscópicas (CLM) e 16 sem lesões macroscópicas (SLM) foram analisados pela histopatologia, pelo teste de imuno-histoquímica (IHC) e pela reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). Não foi observada correlação positiva entre a histopatologia e a imuno-histoquímica. Não houve também, correlação positiva entre número de amostras com lesões características de pneumonia viral e a carga viral de PCV2 medida por qPCR. Analisando os dados obtidos da detecção dos agentes e lesões microscópicas associadas, constatou-se que em 4 amostras analisadas (12,5%) houve uma co-infecção entre o PCV2 e *M. Hyopneumoneae*. Este resultado demonstra uma possível associação deste dois agentes. Novos estudos deverão ser realizados para determinação de outros possíveis patógenos envolvidos na patogenia da PRDC na região da Zona da Mata Mineira.

**PALAVRAS-CHAVE:** Histopatologia. Imuno-histoquímica. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).

### **SUMMARY**

The aim of this study was determine the association between PCV2 and *M. Hyopneumoneae* in pig lung samples. Thirty two lung fragments, from which 16 had macroscopic lesions (CLM) and the other 16 had no macroscopic lesions (SLM), were analyzed by histopathology, immunohistochemistry assays and polymerase chain reaction in real time (qPCR). No positive correlation was observed among the histology and the immunohistochemistry assay (IHC). There was also no positive correlation between the number of samples with viral pneumonia type of lesions and PCV2 viral load measured by qPCR. Analysis of the data obtained by detection of agents and associated microscopic findings showed that PCV2 and *M. Hyopneumoneae* co-infection was found in four samples (12,5%). This result reveals a possible association of these two agents. Further studies are required to determine additional potential pathogens involved in the pathogenesis of the PRDC in the Mata Mineira region, Brazil.

**KEY-WORDS:** Histopathology. Immunohistochemistry. Polymerase chain reaction in Real Time (PCRrt).

---

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa – UFV.\* [julianaevb@gmail.com](mailto:julianaevb@gmail.com)

O Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC) é um conjunto de doenças respiratórias que afetam suínos nas fases de crescimento e terminação. A doença é causada pela associação de patógenos virais (circovirus suíno 2, PRRSV, vírus da influenza suína) e bacterianos (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parassuis*, *Streptococcus suis*) (HANSEN et al., 2010; FACHINGER et al., 2008; KIM et al., 2003, CHOI et al., 2003). Os animais acometidos apresentam dispneia, tosse, anorexia, febre, letargia, diminuição da eficiência alimentar e crescimento retardado (KIM et al., 2003). Diversos estudos demonstram que o PCV2 e o *M. hyopneumoniae* figuram entre os patógenos mais prevalentes na PRDC (HANSEN et al., 2010; KIM et al., 2003).

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o principal agente etiológico responsável pela Pneumonia Enzoótica Suína (SIBILA et al., 2009). A doença é caracterizada por uma pneumonia crônica de alta morbidade e baixa mortalidade, sendo que, os prejuízos causados por essa doença estão relacionados com medicamentos e redução do desempenho produtivo (SARRADEL et al., 2003; MAES et al., 2008; SIBILA et al., 2009).

O PCV2, além de causador de doenças respiratórias, está relacionado como agente causal da Síndrome de Refugagem Multissistêmica Pós-desmame (SRMPD – Porcine Multisystemic Wasting Syndrome), síndrome da dermatite e nefropatia suína (Porcine Dermatitis and Nephropathy syndrome - PDNS), desordens reprodutivas e enterites (SEGALES et al., 2005).

Alguns estudos têm demonstrado o sinergismo da infecção do PCV2 com outros patógenos. Diante da endemicidade da infecção por *M. Hyopneumoneae* e PCV2 em diversas granjas produtoras de suínos no Brasil (KICH e PONTES, 2001), este trabalho teve como objetivo demonstrar a associação do PCV2 e *M. Hyopneumoneae* em amostras de pulmão de suínos.

#### **Isolamento de DNA e Real time Polymerase chain reaction**

As amostras foram utilizadas para a extração de DNA total utilizando o *kit* de extração Wizard<sup>®</sup>, de acordo com as instruções do fabricante. O volume final da eluição para amostras de tecido foi quantificado através de mensuração da densidade. O DNA do PCV2 foi quantificado através do qPCR descrito previamente (OLVERA et al., 2004). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, incluindo amostras e controle avaliados em triplicata. A amplificação e detecção da fluorescência foram realizadas utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 7500 SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA) (Applied Biosystems, Foster City, California). Cada poço continha 12,5 ml de TaqMan Universal Master Mix, 200 nM de cada primer, 200 nM de PCV2 probe e 2.5 µL de amostra, sendo 25 µL o volume final. O

#### **Coleta de amostras**

Amostras de pulmões de 32 suínos em fase de terminação, com idade entre 150 a 180 dias, advindos de oito granjas positivas para *M. Hyopneumoneae* e PCV2 da região da Zona da Mata Mineira foram examinados macroscopicamente por inspeção anatomopatológica. Fragmentos da região crânio-ventral dos lobos craniais foram coletadas e seccionadas em duas partes. Uma parcela foi mantida no freezer a -80°C, para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e a outra parte foi fixada em formol a 10% tamponado para realização de histopatologia e IHC.

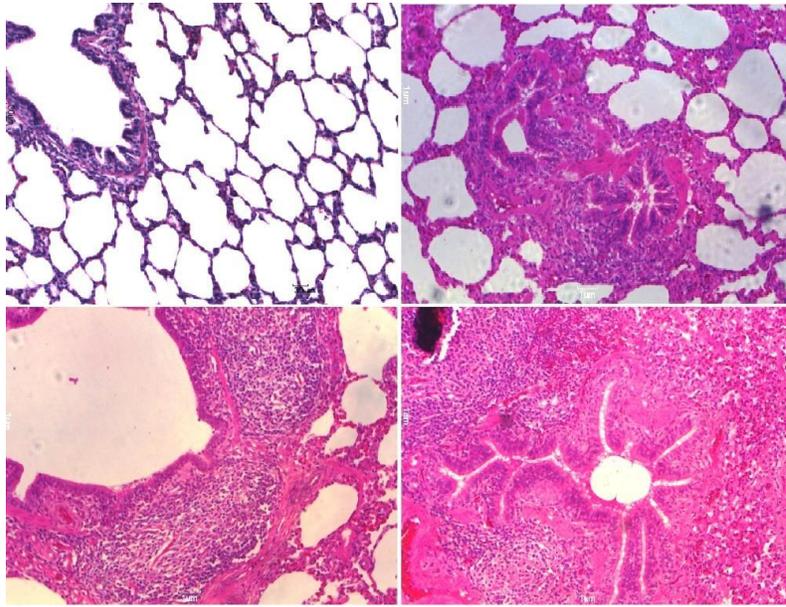
#### **Avaliação histopatológica**

As amostras foram fixadas em formol a 10% tamponado com fosfatos, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram seccionadas com uma espessura de 4 µm com auxílio de micrótomo e corados em hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos examinados foram classificados de acordo com o aspecto microscópico das alterações observadas, seguindo a classificação proposta por Sobestiansky et al. (1999). Quatro categorias foram definidas: Fase 1 - aguda precoce - infiltração peribronquiolar de linfócitos e presença de infiltrado celular no lúmen de alvéolos e dos bronquíolos; Fase 2 - aguda tardia - proliferação linfóide, estendendo-se através da lâmina própria dos bronquíolos e ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos e dos bronquíolos; Fase 3 - sub-aguda - discreta a moderada hiperplasia de folículos linfóides peribronquial e peribronquiolar, ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos, brônquios e bronquíolos, e espessamento da parede alveolar; Fase 4 - crônica - severa hiperplasia dos folículos linfóides peribronquiais e peribronquiliares, provocando estenose dos brônquios e dos bronquíolos, com áreas de atelectasias e ausência de infiltrado no lúmen dos alvéolos (Figura 1).

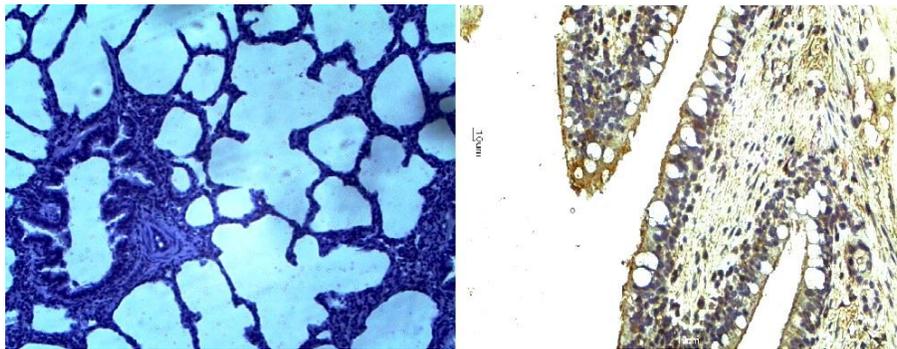
programa do qPCR, correspondia a 10 minutos a 95°C e 2 minutos a 50°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Controles e amostras foram testados juntos em cada reação. A carga viral foi expressa como a média do número de cópias em log<sub>10</sub> por 500 ng do total de DNA por amostra.

#### **Imuno-histoquímica**

Para realização da IHC utilizou-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB). Uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol absoluto foi utilizada para o bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, as amostras foram imersas em tampão citrato de pH 6 a uma temperatura de 90°C por 20 minutos para a recuperação antigênica. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 10% em água destilada por 30 minutos. O tecido foi então incubado por 12 horas com anticorpo



**Figura 1** - Fotomicrografia para avaliação histológica de pulmões de suínos. **A:** corte histológico de fragmento sem lesão significativa (fase 0). Seta preta: paredes alveolares delgadas e ausência de infiltrado inflamatório. **B:** fragmento de tecido pulmonar evidenciando lesão de fase aguda tardia (fase 2). Seta preta: proliferação linfóide, estendendo-se através da lâmina própria dos bronquíolos. Seta Vermelha ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos e dos bronquíolos. **C:** fragmento de tecido pulmonar evidenciando a lesão de fase sub-aguda tardia (fase 3). Seta preta: moderada hiperplasia de folículos linfóides peribronquiolar, Seta vermelha: ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos, brônquios e bronquíolos. Seta verde: espessamento da parede alveolar. **D:** fragmento de tecido pulmonar evidenciando a lesão de fase crônica (fase 4). Seta preta: severa hiperplasia dos folículos linfóides peribronquiolares provocando estenose. Seta vermelha: áreas de atelectasia. Seta verde: ausência de infiltrado no lúmen dos alvéolos.



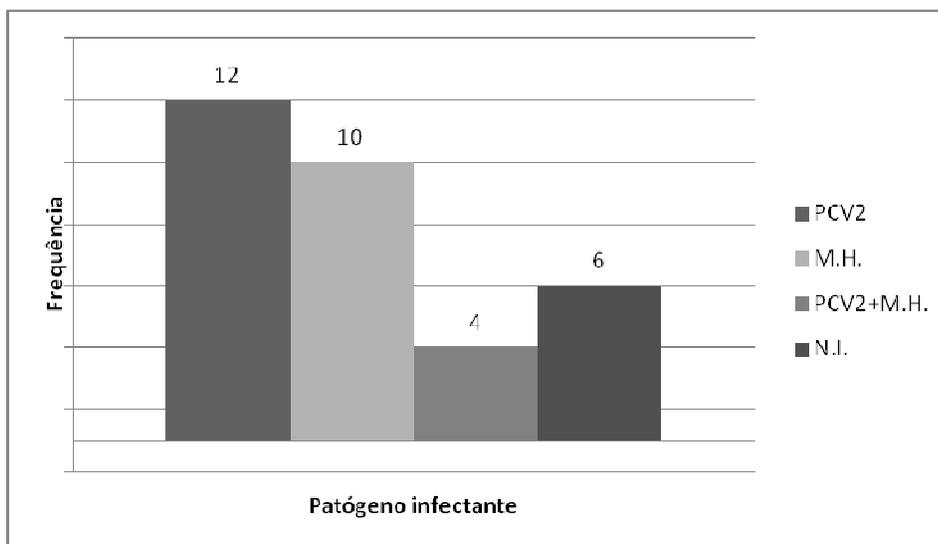
**Figura 2** - Detecção do *M. Hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos por Imuno-histoquímica (IHC). **(A)** Amostra negativa. **(B)** Amostra positiva (Seta em imunomarcção presente).

**Tabela 1** - Distribuição dos pulmões avaliados de acordo com o grau de lesão microscópica.

Grau de Pneumonia	Prevalência
0	4 (12,5%)
1	0 (0%)
2	6 (18,75%)
3	18 (56,25%)
4	4 (12,5%)

**Tabela 2** - Distribuição das amostras de acordo com o grau de lesão para *M. hyopneumoniae* infectados pelo PCV2 e carga viral medida pela qPCR.

Grau de lesão	Número de animais afetados	Carga viral
0	3	0,702 ± 0,319 <sup>A</sup>
1	0	-
2	1	1,024 <sup>A</sup>
3	10	0,936 ± 0,366 <sup>A</sup>
4	3	0,773 ± 0,261 <sup>A</sup>
<b>Total</b>	<b>17</b>	-



**Figura 3** - Agrupamento dos animais de acordo com o patógeno infectante. N.I.: não identificado por nenhum dos patógenos pesquisados.

primário (IgG de coelho anti *Mycoplasma hyopneumoniae* advindo da Embrapa Suínos e Aves – Concórdia-SC), diluído 1:100 em PBS (pH 6,0). O cromógeno utilizado foi o DAB e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. Controles positivos e negativos foram inclusos em cada processamento das amostras. Baseado na intensidade de coloração, os fragmentos foram classificados como: (1) Imunomarcação ausente e (2) imunomarcação presente (Figura 2).

## RESULTADOS

### **Detecção de *M. hyopneumoniae* x avaliação histopatológica**

Em 28 (87,5%) amostras as lesões microscópicas encontradas se enquadram nas fases 2, 3 e 4 (Figura 1) de acordo com a classificação proposta por Sobestiansky et al (1999). Nenhuma amostra foi classificada como grau 1. Lesões microscópicas não significativas estavam presentes em 4 (12,5%) amostras (Tabela 1).

De acordo com a histopatologia, 27 (84,37%) dos 32 pulmões continham lesões características de *M. hyopneumoniae*. Dentre as amostras com lesões sugestivas de infecção, 14 (43,75%) apresentaram marcação para IHC. Na maioria das amostras avaliadas, a marcação IHC observada foi homogênea, não permitindo estabelecer uma classificação em diferentes categorias.

### **Detecção do PCV2 x avaliação histopatológica**

Não foi verificada uma correlação positiva entre o exame microscópico das lesões sugestivas de infecção por PCV2 (pneumonia intersticial) e a detecção do DNA viral. A pneumonia intersticial, característica de infecções virais, foi observada em 20 (62,5%) das 32 amostras, enquanto que o PCV2 foi detectado em apenas 11 (55,5%) dos 20 pulmões que apresentavam pneumonia intersticial.

### **Detecção de *M. hyopneumoniae* x PCV2**

Dentro das amostras analisadas pela IHC e qPCR, 12 amostras apresentaram infecção exclusivamente pelo PCV2. Dez amostras foram positivas somente para *M. Hyopneumoniae* e quatro amostras apresentaram coinfeção. Seis amostras foram consideradas negativas para os patógenos pesquisados (Figura 3).

A carga viral do PCV2 nas diferentes categorias de lesão do *M. Hyopneumoniae* mostrou-se uniforme em todas as amostras testadas, não havendo relação entre o grau de lesão pulmonar e número de cópias do genoma viral (Tabela 2).

### **Análise estatística**

Foram realizados os testes estatísticos de Pearson e Tukey para avaliar correlação entre as técnicas diagnósticas utilizadas. A análise estatísticas dos dados do qPCR foram realizadas usando o programa Prism vs 5,02 (Graph pad software Inc., EUA). As cópias do genoma de PCV2 das amostras de

pulmão foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) testes ( $p < 0,01$ ).

## DISCUSSÃO

Na maioria das amostras avaliadas foram encontradas lesões compatíveis com infecção por *M. hyopneumoniae*. 84,37%, apresentaram lesões histopatológicas, entretanto somente 43,75% foram marcadas no teste de detecção para o *M. Hyopneumoneae*. As amostras coletadas não foram representativas quanto ao tamanho. Estes resultados, concordam com Cai et al. (2007) que concluíram que o risco da obtenção de resultados falso-negativos existe uma vez que o fragmento de tecido utilizado para este teste é muito pequeno.

A pneumonia intersticial foi encontrada em 62,5% das amostras. Porém, o PCV2 foi detectado em 55,5%. Não houve uma correlação positiva entre número de amostras positivas e a carga viral medida por qPCR nos tecidos analisados. Os resultados encontrados estão de acordo com Brunborg et al. (2004) e Silva et al. (2011) que encontraram uma maior carga viral em linfonodos, quando comparados a outros órgãos como rim, intestino, baço e fígado. Este resultado pode ser explicado pela fisiopatologia do vírus, que tem órgãos linfoides como principal alvo (CHANG et al., 2006).

A pneumonia intersticial detectada nos pulmões analisados neste estudo é uma alteração anatomopatológica causada frequentemente por vírus (SORENSEN et al., 1997). Além do PCV2, o coronavírus respiratório suíno (PRCV), o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) e vírus da influenza suína (H1N1) figuram entre os principais vírus causadores de doença respiratória em suínos. O PRRSV não está presente no rebanho suíno brasileiro (CIACCI-ZANELLA, J.R., 2004; PESCADOR et al., 2007). Brentano et al. (2002) realizaram um estudo soropidemiológico para pesquisa do PRCV e do H1N1 no rebanho suíno brasileiro, verificando somente a presença de anticorpos contra o H1N1. Portanto, as lesões intersticiais pneumônicas presentes em animais que não apresentam PCV2 no pulmão podem ter sido causadas por um outro agente viral, como por exemplo o H1N1.

Analisando os dados obtidos da detecção dos agentes e lesões microscópicas associadas, constatou-se que em quatro amostras analisadas (12,5%) houve uma coinfeção entre o PCV2 e *M. Hyopneumoneae*. Este resultado sugere uma possível associação deste dois agentes. Novos estudos deverão ser realizados para determinação de outros possíveis patógenos envolvidos na patogênese da PRDC na região da Mata Mineira.

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma possível associação os agentes *M. Hyopneumoniae* e PCV2. Novos estudos

deverão ser realizados para determinação de outros possíveis patógenos envolvidos na patogenia da PRDC na região da Mata Mineira.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Professor Abelardo Silva Júnior (Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa), pela colaboração no desenvolvimento do experimento e auxílio na escrita do manuscrito.

#### REFERÊNCIAS

- BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; PIFFER, I. A. Levantamento Soroepidemiológico para Coronavírus Respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos Vírus de Influenza H3N2 E H1N1 em Rebanhos Suínos no Brasil. **Comunicado Técnico, Embrapa Aves e Suínos, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2002.
- BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. M.. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **Jornal of Virological Methods**, v.122, p.171–178, 2004.
- CAI, H. Y.; VAN DREUMEL, T.; MCEWEN, B.; HORNBY, G.; BELL-ROGERS, P.; MCRAILD, P.; JOSEPHSON, G.; MAXIE, G., Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.91–95, 2007.
- CHANG, H. W.; JENG, C. R.; LIN, T. L.; LIU, J. J.; CHIOU, M. T.; TSAI, Y. C.; CHIA, M. Y.; JAN, T. R.; PANG, V. F. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.110, p.207–219, 2006.
- CHOI Y. K.; GOYAL S. M.; JOO H. S. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.735–737, 2003.
- CIACCI-ZANELLA J. C.; TROMBETTA C.; VARGAS I.; COSTA D. E. M. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.449-455, 2004.
- DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**. v.111, n.3-4, p.223-229, 2005.
- FACHINGER V.; BISCHOFF R.; JEDIDIA S. B.; SAALMÜLLER A.; ELBERS K.. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. **Vaccine**, v.26, p.1488-1499, 2008.
- HANSEN M. S.; PORS S. E. V.; BILLE-HANSEN S. K. J.; KJERULFF, N. O. L An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, p.120-131, 2010.
- KICH, J. D.; PONTES, A. P. Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, X, Porto Alegre. **Anais. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**, v.1, p.58-67, 2001.
- KIM, J.; CHUNG H, K.; CHAE C.. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v.166, p. 251–256, 2003.
- MAES, D.; SEGALÉS J.; MEYNS T.; SIBILA M.; PIETERS M.; HAESEBROUCK F.. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.297–309, 2008.
- OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **Journal of Virological Methods**. v.80, p.117-75, 2004.
- PESCADOR C. A.; BANDARRA, P. M.; CASTRO, L. A.; ANTONIASSI, N. A. B.; RAVAZZOLO, A. P.; SONNE L.; DRIEMEIER, C. E. F. C. D. Co- infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27, p.425-429, 2007.
- SARRADELL, J.; ANDRADA M.; RAMÍREZ A. S.; FERNÁNDEZ A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; JOVER A.; LORENZO H.; HERRÁEZ P.; F. A RODRÍGUEZ. Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Pathology**, v.40, p.395–404, 2003.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. (2005) Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v.24, n.3, p.109-124, 2002.
- SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current

perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, p. 221–231, 2009.

SILVA, F. M. F.; JUNIOR, A. S.; VIDIGAL, P. M. P.; OLIVEIRA, C. R.; VIANA, V. W.; SILVA, C. H. O.; VARGAS, M. I.; FIETTO, J. L. R.; ALMEIDA, M. R. **Porcine Circovirus-2 Viral Load Versus Lesions in Pigs: Perspectives for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. Journal of Comparative Pathology**, v.144, p.296-302, 2011.

SOBESTIANSKY, J. Pneumonia enzoótica. **Clínica e patologia suína**. 2.ed. Goiânia, Goiás: Art 3 Impressos Especiais, p.359, 1999.

SORENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; FEENSTRA, A. A.; FELD, N. C.; FRISS, N. F.; BILLE-HANSEN, V.; JENSEN, N. E.; PEDERSEN, M. W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays, **Veterinary Microbiology**, v.54, p.23-34, 1997.