



JOANA RESENDE PAGLIS

**PROCESSAMENTO DE TECIDOS EM MICRO-
ONDAS PARA O DIAGNÓSTICO
HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO RÁPIDO DE LESÕES EM
LINFONODOS DE SUÍNOS NA INSPEÇÃO
SANITÁRIA.**

**LAVRAS – MG
2013**

JOANA RESENDE PAGLIS

**PROCESSAMENTO DE TECIDOS EM MICRO-ONDAS PARA O
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO
RÁPIDO DE LESÕES EM LINFONODOS DE SUÍNOS NA INSPEÇÃO
SANITÁRIA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pedro Soares Bezerra Jr.

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Paglis, Joana Resende.

Processamento de tecidos em micro-ondas para o diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico rápido de lesões em linfonodos de suínos na inspeção sanitária / Joana Resende Paglis. – Lavras : UFLA, 2013.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Pedro Soares Bezerra Júnior.

Bibliografia.

1. Micro-ondas. 2. Linfonodo. 3. Suínos. 4. Inspeção sanitária. 5. Circovírus Suíno tipo 2. I. Universidade Federal de Lavras. II.

Título.

CDD – 636.0896075

JOANA RESENDE PAGLIS

PROCESSAMENTO DE TECIDOS EM MICRO-ONDAS PARA O
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO
RÁPIDO DE LESÕES EM LINFONODOS DE SUÍNOS NA INSPEÇÃO
SANITÁRIA.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA 25 de Julho de 2013

Dr. Djeison Lutier Raymundo

Dr. Enio Ferreira

Dra. Mary Suzan Varaschin

Dr. Pedro Soares Bezerra Jr.

Orientador

LAVRAS – MG

2013

Dedico às minhas meias, as meias que me acompanharam a vida toda, as meias que adquiri ao longo desses últimos dois anos, as meias que sempre estarão comigo me apoiando para que eu nunca perca a fé de que andar é preciso;

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora;

Aos meus pais, Carlos e Dorotéia, que sempre me apoiaram e me motivaram a seguir em frente;

À Júlia, minha irmã que sempre aturou minhas loucuras e me proporcionou momentos de descontração;

Ao Rodrigo, amor, amigo e companheiro, que neste último ano foi como um fôlego reserva em todos os momentos, que me apoiou e encorajou;

Aos que já se foram, são insubstituíveis, que zelaram por mim durante toda essa jornada;

A minha Tia Zélia, uma segunda mãe para mim;

Ao Professor Pedro, pela orientação, pelo ensino, pela paciência;

Aos membros da banca, pela disponibilidade, por sempre se fazerem prontos para ajudar no que fosse necessário;

Às amigas, estas são essenciais para aliviar a seriedade do mestrado;

Aos estagiários e pós-graduandos do Setor de Patologia especialmente à Débora, Priscila e Rafael. Sem vocês os dias de trabalho seriam menos divertidos. Obrigada, pela ajuda, pelo apoio e pela paciência;

Ao Welson, por manter os laboratórios sempre limpos e agradáveis ao trabalho;

À Universidade Federal de Lavras;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

RESUMO

As pesquisas por novas técnicas de diagnóstico têm avançado em diversos sentidos, entre eles o de obter metodologias mais eficientes diminuindo o tempo de processamento de amostras, economizando reagentes e utilizando reagentes menos nocivos à saúde humana. Com este estudo avaliou-se a eficiência e utilização do processamento de tecidos em micro-ondas em lesões de linfonodos de carcaças suínas desviadas ao departamento de inspeção final em um frigorífico. Para tal, foi realizado um estudo comparativo entre o processamento em micro-ondas e o processamento convencional de tecidos na análise histopatológica e imuno-histoquímica diagnóstica e da qualidade do local de processamento. Os linfonodos foram coletados em um frigorífico na cidade de Lavras, Minas Gerais e encaminhados para ambos os processamentos no setor de patologia veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, durante um período de seis meses. Quando avaliados os diagnósticos de carcaça não houve diferença significativa entre processamentos. No diagnóstico dos linfonodos apenas houve diferença significativa quanto à detecção de depleção linfoide e linfadenite supurativa sendo que no processamento convencional têm-se mais chances de se encontrar linfonodos com depleção linfoide e no processamento em micro-ondas foi possível encontrar as linfadenites supurativas. Em relação à qualidade dos cortes histológicos em termos de morfologia celular e nuclear não houve diferença estatística significativa pelo teste de Qui-quadrado no nível de significância de 0,05 entre os processamentos. No entanto, as lâminas processadas pelo método convencional foram mais bem avaliadas em termos de qualidade da coloração pela hematoxilina e eosina. Os linfonodos que apresentaram depleção em folículos linfoides foram submetidos à imuno-histoquímica para circovírus suíno tipo 2. Nos tecidos processados de modo convencional houve um maior número de casos positivos que no processamento em micro-ondas, sendo 24 positivos e 7 positivos respectivamente. Os dados do presente estudo indicam que a aplicação do processamento em micro-ondas em tecidos de suínos é bastante promissora por trazer uma redução substancial do tempo de processamento sem diferenças substanciais em relação aos diagnósticos obtidos e na qualidade dos cortes histológicos. Desta forma o processamento de tecidos em micro-ondas pode ser útil como auxílio na tomada de decisão para a destinação de carcaças desviadas ao departamento de inspeção final.

Palavras chave: Micro-ondas. Linfonodo. Suíno. Inspeção Sanitária. Circovírus suíno tipo 2. Linfadenite.

ABSTRACT

Research for new diagnostic techniques have advanced significantly in several ways, including obtaining more efficient methodologies decreasing sample processing time, saving reagent and utilizing less harmful reagents to human health. In this study it was evaluated the efficiency and use of microwave tissue processing in lymph node lesions of swine carcasses diverted to the final inspection department in a abattoir. For such, it was done a comparative study between microwave tissue processing and conventional tissue processing to evaluate possible differences in diagnosis and slide quality. Lymph nodes were collected in a abattoir in the city of Lavras, Minas Gerais, in the sector of pathology of the Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras, and forwarded to both tissue processing methods for a period of 6 months. When evaluated the carcass diagnosis there were no significant difference between tissue processing methods. The lymph node diagnosis were only statistically different when regarding lymphoid depletion and suppurative lymphadenitis being the conventional tissue processing has more chances of encountering lymph node with lymphoid depletion and microwave tissue processing has more chances of encountering suppurative lymphadenitis. In regards the quality of the histological slides in terms of cellular e nuclear morphology there was no significant difference between tissue processing methods. However slides from the conventional tissue processing were better evaluated in terms of hematoxilyn e eosin staining quality. The lymph nodes that presented depletion in lymphoid follicles were submitted to immunohistochemistry for swine circovirus type 2. The tissues processed conventionally held a larger number of positive cases than the microwave processed tissues, being 24 and 7 positives respectively. The data of the present study indicate that the application of microwave tissue processing in swine tissue is promising bringing a substantial reduction of processing time with no substantial differences concerning the diagnosis found and quality of histological slides. Hence microwave tissue processing may be used in the decision making for the destination of carcasses forwarded to the final inspection department.

Key words: Microwave. Lymph node. Swine. Sanitary Inspection. Swine circovirus type 2. Lymphdenitis.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Figura 1	Linfonodo inguinal, suíno, processamento convencional. Marcação imuno-histoquímica para circovirose em células no centro de um folículo linfoide. Obj. 20.....	65
Figura 2	Linfonodo inguinal, suíno, processamento convencional. Marcação imuno-histoquímica para circovirose em células no centro de um folículo linfoide. Obj. 40.....	65
Figura 3	Linfonodo inguinal, suíno, processamento no micro-ondas. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.....	66
Figura 4	Linfonodo inguinal, suíno, processamento histopatológico convencional. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.....	67

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Tabela 1	Quantidade de carcaças desviadas ao departamento de inspeção final por causas patológicas ou não patológicas e seu destino final no período de março a setembro de 2012.....	63
Tabela 2	Diagnóstico microscópico dos linfonodos submetidos aos processamentos rápidos e convencionais no período de março e setembro de 2012.....	64
Tabela 3	Avaliação da coloração da qualidade das lâminas de linfonodos submetidas ao processamento em micro-ondas e convencional no período de março a setembro de 2012.....	67

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
	Principais agentes bacterianos envolvidos nas linfadenites de suínos.....	17
2.1	Principais causas de condenação infecciosa em suínos.....	18
2.2	Principais causas de condenação infecciosa em suínos.....	18
2.2.1	Pleuropneumonia Suína.....	19
2.2.1.1	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	19
2.2.1.2	Epidemiologia.....	20
2.2.1.3	Patogenia.....	21
2.2.1.4	Lesões ao Abate.....	23
2.2.1.5	Histopatologia.....	24
2.2.1.6	Diagnóstico.....	24
2.2.2	Pneumonia Enzoótica.....	25
2.2.2.1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	25
2.2.2.2	Epidemiologia.....	26
2.2.2.3	Patogenia.....	27
2.2.2.4	Lesões ao Abate.....	28
2.2.2.5	Histopatologia.....	28
2.2.2.6	Diagnóstico.....	28
2.2.3	Micobacterioses.....	29
2.2.3.1	<i>Mycobacterium sp.</i>	29
2.2.3.2	Epidemiologia.....	31
2.2.3.3	Patogenia.....	32
2.2.3.4	Lesões ao Abate.....	33
2.2.3.5	Histopatologia.....	34
2.2.3.6	Diagnóstico.....	34
2.3	Circovírus Suíno tipo 2 (PVC2).....	35
2.3.1	Circovírus Suíno tipo 2.....	35
2.3.2	Epidemiologia.....	35
2.3.3	Patogenia.....	36
2.3.4	Lesões ao Abate.....	37
2.3.5	Histopatologia.....	37
2.3.6	Diagnóstico.....	37

2.4	Importância da inspeção das linfadenites infecciosas de suínos na saúde pública.....	37
2.5	Teste Imuno-histoquímico.....	49
2.6	Processamento em Micro-ondas.....	41
	REFERÊNCIAS.....	45

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO "PROCESSAMENTO DE TECIDOS EM MICRO-ONDAS PARA O DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO RÁPIDO DE LESÕES EM LINFONODOS EM SUÍNOS NA INSPEÇÃO SANITÁRIA.".....

	Resumo.....	55
1	Introdução.....	57
2	Material e Métodos.....	58
3	Resultados.....	62
4	Discussão.....	68
5	Conclusão.....	70
6	Referências.....	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil atualmente é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com uma produção de 3.227 mil toneladas em 2011. O polo suinícola brasileiro é localizado na região sul do país, , porém, Minas Gerais é atualmente o quarto estado de maior produção, assim como em números de matrizes alojadas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). A suinocultura industrial cresce a cada ano quando comparado com a suinocultura de subsistência, prova disso é o número de suínos que foram abatidos sob os cuidados do sistema de inspeção federal no ano de 2011 totalizando 30.807.512 milhões de animais.

A inspeção sanitária é utilizada para avaliar a saúde do rebanho comercializado contribuindo para estudos epidemiológicos (SANCHEZ-VASQUEZ et al., 2011) e para garantir segurança em termos de saúde pública e uma maior valorização do produto final gerado. O uso de monitorias patológicas em abatedouros é uma importante fonte de informações para o acompanhamento sanitário dos suínos, com finalidade de identificar e quantificar as prevalências das doenças, bem como a severidade das lesões encontradas. As perdas econômicas decorrentes das condenações recaem tanto sobre os produtores como sobre a indústria.

As monitorias sanitárias também auxiliam ao produtor como um mecanismo de vigilância da saúde de seus rebanhos. Existem diversos modos de realizar essas monitorias seja uma avaliação clínica, laboratorial, patológica e de abate, porém, quando usados em combinação duas ou mais monitorias podemos ter uma visão ampla do impacto de uma doença. Algumas doenças que acometem suínos que permitem a visualização macroscópica são facilmente reconhecidas na inspeção, embora algumas vezes necessitem de confirmação histopatológica. Há, porém, algumas enfermidades igualmente importantes que podem não ser visualizadas macroscopicamente. Para estas, exames

histopatológicos podem permitir uma destinação mais adequada dos órgãos e carcaça acometida.

Nas últimas décadas a tecnologia de processamento de tecidos em microondas tem sido estudada e aplicada para substituir o processamento convencional de tecidos, particularmente na patologia humana. Esta relativamente recente aplicação da irradiação de tecidos com micro-ondas para o processamento de tecidos para histopatologia tem trazido avanços em termos de redução do tempo para obtenção dos cortes, além de vantagens em relação à preservação de antígenos e ácidos nucleicos (HAFAJEE; LEONG, 2004; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006). Essa forma de processamento pode proporcionar a obtenção de cortes histológicos em tempo menor quando comparado processamento convencional, permitindo um diagnóstico histopatológico rápido e seguro.

A histopatologia e a imuno-histoquímica têm sido empregadas como importantes técnicas de auxílio no diagnóstico de lesões em linfonodos de suínos no abatedouro em diversos artigos (KOMIJN et al., 2007; MORÉS et al., 2007). Tais técnicas têm fornecido um diagnóstico seguro, permitindo a tomada de decisão em relação à destinação da carcaça e ao controle de doenças com potencial zoonótico (MORÉS et al., 2007).

Desta forma, a aplicação deste método de processamento rápido poderia possibilitar um diagnóstico rápido, das principais causas de lesões em linfonodos de suínos em tecidos fixados em formol. Além disso, a possibilidade da pesquisa e diagnóstico rápido em tecidos fixados em formol poderia reduzir riscos inerentes ao manuseio e transporte do material fresco contaminado que apresenta risco biológico, visto que pode conter agentes zoonóticos.

O objetivo com este trabalho é avaliar a viabilidade do processamento rápido de tecidos em micro-ondas como ferramenta de auxílio na avaliação de carcaças de suínos desviadas ao serviço de inspeção permanente de um

abatedouro visando sua utilização futura para uma destinação de carcaças mais segura e para minimizar possíveis perdas econômicas relativas a esta destinação.

PRIMEIRA PARTE
REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Principais agentes bacterianos envolvidos nas linfadenites de suínos

A linfadenite é uma importante afecção que assola a suinocultura no Brasil e em todo o mundo, particularmente pelo alto prejuízo econômico com a condenação de carcaças e por ser uma doença crônica debilitante (LARA et al., 2009). Dentre os agentes infecciosos envolvidos com as linfadenites de suínos, destaca-se o Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*. No entanto, vários outros agentes bacterianos, como *Mycobacterium bovis*, *Rhodococcus equi* e *Streptococcus* β -hemolítico, *Staphylococcus* sp., *Nocardia* sp., *Streptococcus* sp., *Arcanobacterium pyogenes*, e virais, como circovírus suíno, podem provocar lesões em linfonodos desta espécie animal (BALIAN et al., 1997; LARA et al., 2009; MORÉS et al., 2007).

As linfadenites infecciosas, principalmente as granulomatosas, vêm adquirindo importância, não por afetar o desempenho dos animais, mas pelo seu potencial zoonótico e pelos prejuízos provocados aos produtores e para a indústria suinícola (KOMIJIN et al., 2007; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

As micobactérias envolvidas na etiologia da doença em suínos foram agrupadas em dois complexos: *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e *Mycobacterium avium* (MAC), sendo o primeiro composto principalmente pelo *M. tuberculosis* e *M. bovis* e o segundo por *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006). O complexo MTC é responsável pela tuberculose clássica. No entanto, os agentes do complexo MAC são considerados como os principais causadores da linfadenite granulomatosa suína, que é na maioria das vezes assintomáticas, sendo diagnosticadas somente na linha de abate (BALIAN et al., 1997; MARTINS et al., 2004; MORÉS;

SILVA, 2001; THOEN et al., 2006). Aproximadamente 15 tipos de sorovares do complexo *M. avium* foram isolados em diversos países demonstrando a distribuição mundial das micobacterioses (THOEN et al., 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes, aeróbios e imóveis, não formam esporos, possuem potencial zoonótico e cursam com o desenvolvimento de processos infecciosos crônicos com formação de reações granulomatosas típicas (CORRÊA; CORRÊA, 1992; QUINN et al., 2005). Bactérias do gênero *Mycobacterium* são altamente resistentes ao álcool, ácido e à dissecação podendo sobreviver vários meses nas instalações dos animais e durante anos no solo (LARA et al., 2009; MIRANDA, 2010). Desinfetantes a base de hipoclorito de sódio, cresóis, fenóis e aldeídos, como formol, apresentam boa ação bactericida sobre as micobactérias (MIRANDA, 2010; MORÉS; SILVA, 2001). Estas podem ser destruídas também pelo calor quando expostas a temperatura em torno de 65,5 °C por 10 minutos (LARA et al., 2009; MIRANDA, 2010).

O *Rhodococcus equi* é uma bactéria cocobacilar intracelular facultativa Gram positiva presente no solo que pode causar quadros de broncopneumonia e enterite piogranulomatosa em potros. Em suínos, semelhante às micobactérias, o *Rhodococcus equi* pode provocar uma linfadenite cervical granulomatosa que na avaliação macroscópica durante a inspeção pode ser confundida com tuberculose. O *R. equi* possui também um potencial zoonótico podendo provocar quadros de pneumonia em indivíduos imunossuprimidos (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

2.2 Principais causas de condenação infecciosa em suínos

Existem diversas causas infecciosas que tem por consequência a condenação total ou parcial de carcaças de suínos. Na sequência desta revisão serão descritas com maiores detalhes algumas das principais causas de

condenações observadas no período de estudo, além da micobacteriose devido ao seu importante potencial zoonótico.

2.2.1 Pleuropneumonia Suína

A pleuropneumonia suína é uma doença respiratória amplamente disseminada mundialmente nos rebanhos industriais. É uma doença que acomete todas as categorias de uma granja, principalmente na etapa de terminação resultando prejuízos consideráveis para suinocultura tais como redução do ganho de peso, aumento do índice de conversão alimentar e custos com tratamentos e profilaxia de rebanho (CHIERS et al., 2010; COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; SOUZA et al., 2008).

2.2.1.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

O agente causador da doença é denominado *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porém, foi primeiro reconhecido e citado na literatura como *Haemophilus pleuropneumoniae*. Na década de 80 ela foi reclassificada no gênero *actinobacillus* depois de estudos de DNA que demonstrou semelhança com a bactéria *Actinobacillus lignieresii* (COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; MARSTELLER; FENWICK, 1999).

A bactéria *A. pleuropneumoniae* é considerada um cocobacilo gram negativo, não móvel, aeróbico ou anaeróbico facultativo e fermentador de glicídeos. Dito também como uma bactéria hemolítica pela sua capacidade de obtenção de ferro pela transferrina suína. Em meio de cultura é necessário a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), 37 °C e presença de gás carbônico a 5% para haver o crescimento da mesma (CHIERS et al., 2010; COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; VAZ; SILVA, 2004).

O *A. pleuropneumoniae* possui dois biótipos e quinze sorotipos. O biótipo 1 são aquelas que dependem de NAD para sua multiplicação e o biótipo

2 são aquelas que não são dependentes de NAD, porém, essa diferença não torna a bactéria incapaz de causar a doença só determinará se ela será mais ou menos patogênica. Os sorotipos são determinados pelas diferenças nos antígenos capsulares, sendo que os sorotipos 12 e 13 pertencem ao biótipo 2 e o restante ao biótipo 1. A importância de se conhecer qual sorotipo está presente no rebanho facilitará a profilaxia e os testes sorológicos a serem utilizados sendo que as vacinas são soro-específicas (CHIERS et al., 2002; COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; COSTA et al., 2004; VAZ; SILVA, 2004).

Além dos dois biótipos e 15 sorotipos, estes últimos são capazes de produzir três tipos de exotoxinas diferentes a ApxI, ApxII e ApxIII. As exotinas possuem níveis de citotoxicidade e capacidade hemolítica diferente entre elas. Essas associadas à lipossacarídeos e proteínas de superfície são os fatores que constroem a patogenicidade da bactéria (CHIERS et al., 2010; COSTA et al., 2004; DECUADRO-HANSEN; WERLANG; WOLLMANN, 2009; FERRAZ et al., 2010).

2.2.1.2 Epidemiologia

A transmissão da pleuropneumonia é por meio do contato direto com secreções do trato respiratório de animais infectados também existindo a possibilidade de transmissão por aerossóis por meio de curtas distâncias. O *A. pleuropneumoniae* pode permanecer viável no ambiente por meio da presença de secreções e matéria orgânica. A introdução de suínos portadores em um rebanho sem incidência prévia é a forma mais importante de transmissão (SOUZA et al., 2008; VAZ; SILVA, 2004). Em rebanhos cronicamente infectados a doença ocorre preferencialmente na etapa de terminação, mas existem sorotipos que podem infectar categorias de animais mais jovens. Isso se deve às condições multifatoriais, tais como superlotação, agrupamento de lotes e condições de manejo adversas (CHIERS et al., 2010; MAES et al., 2001).

O desenvolvimento da doença é multifatorial, dependendo de fatores como a patogenicidade do sorotipo introduzido, estado imunológico dos animais, condição sanitária da granja, manejo e densidade animal. Os sorotipos prevalentes no Brasil são os 3, 5 e 7 sendo que outros já foram isolados (SOUZA et al., 2008; VAZ; SILVA, 2004).

O controle da pleuropneumonia é geralmente feito com medicação, vacinação e um manejo adequado. A antibioticoterapia apresenta maior eficácia nos casos agudos, ou seja, nas fases iniciais da doença (MAES et al., 2001). A utilização de antibióticos com fins de prevenção, seja de modo intermitente ou contínuo, tem sido também empregada, porém, com riscos relacionados à resistência bacteriana (CHIERS et al., 2002; MAES et al., 2001). O diagnóstico é feito a partir de cultura bacteriana de swabs de secreções nasais e tonsilares (CHIERS et al., 2010).

A vacinação de rebanho é empregada devido à larga escala de vacinas disponíveis hoje no mercado. Em rebanhos endemicamente afetados, os leitões recém-nascidos recebem uma cobertura imunológica a partir da mãe que perdura até aproximadamente 9 semanas após receberem o colostro (FERRAZ et al., 2010; MARSTELLER; FENWICK, 1999). Nestes há necessidade da vacinação, pois surtos da doença normalmente podem ocorrer entre 12 a 16 semanas de idade. No entanto, assim como no uso de antibióticos, essas apenas impedem a apresentação da doença com visualização dos sinais clínicos, mas não impede que o trato respiratório seja colonizado e que o animal se torne um portador (FERRAZ et al., 2010; MAES et al., 2001).

2.2.1.3 Patogenia

A patogenicidade da pleuropneumonia é dependente da virulência de seus sorotipos, das exotoxinas produzidas pelas mesmas e outros fatores de

virulência tais como capsula e os lipopolissacarídeos (MARSTELLER; FENWICK, 1999).

Na maioria das vezes ela é dose dependente, ou seja, a manifestação clínica e estado infeccioso do animal dependerá da quantidade de bactéria presente no momento do primeiro contato. Doses menores têm como consequência a soroconversão sem a presença da doença clínica ao contrário de doses maiores que resulta na doença clínica (MARSTELLER; FENWICK, 1999). A doença pode se manifestar nas formas superaguda, aguda, subaguda ou crônica. A doença aguda se caracteriza por doença clínica associada a uma alta mortalidade enquanto que a forma crônica por pouco ou quase nenhum sinal clínico evidente (MAES et al., 2001).

A forma superaguda, que se caracteriza por uma evolução rápida, leva à morte os animais acometidos sem nenhum sinal clínico aparente. A apresentação clínica da doença aguda se dá com o aumento de temperatura corporal, quadros de insuficiência cardíaca e respiratória, anorexia podendo também culminar na morte dos animais. Os animais que superam a fase aguda ainda podem desenvolver a forma subaguda e crônica que possui como já citado acima sinais clínicos menos expressivos, porém, gera perda de ganho de peso diário e cicatrizes pulmonares que desacelera o crescimento habitual e assim acarreta em prejuízo econômico (FERTAZ et al., 2010; VAZ; SILVA, 2004).

A bactéria atinge o trato respiratório inferior após a inalação de aerossóis e por meio do muco, proteínas e as células do hospedeiro coloniza os bronquíolos terminais e as células epiteliais alveolares causando danos nestas áreas. A adesão das bactérias às células ocorre por meio de fatores que favorecem a mesma, tais como as fímbrias. É dito também que essa colonização se dá por meio da formação de biofilme (CHIERS et al., 2010).

Atualmente são relatados 15 sorotipos relacionados a esta enfermidade. Na maioria das vezes um rebanho, ou seja, uma granja é acometida por um único

sorotipo. Porém, uma alta movimentação de animais nesta mesma granja permite a presença de mais de um sorotipo (CHIERS et al., 2010).

O gene *apxA* do *Actinobacillus pleuropneumoniae* produz 3 exotoxinas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ApxI, ApxII e ApxIII (VAZ; SILVA, 2004). Existem relatos de uma ApxIV que é produzida apenas *in vivo* e por todos os sorotipos.

A secreção das exotoxinas mencionadas acima resulta na lise das células epiteliais alveolar, células endoteliais, hemácias, neutrófilos e macrófagos. Os lipopolissacarídeos presente na capsula bacteriana aumentam a sua virulência provocando a produção ativa de citocinas inflamatórias e necrose das células do epitélio pulmonar por meio da ligação de receptores Toll-like. Proteases também participam da virulência na injúria tecidual, pois quebram barreiras celulares assim como a actina e hemoglobina (CHIERS et al., 2010).

2.2.1.4 Lesões ao Abate

A inspeção sanitária no momento do abate é fundamental para a identificação de lesões compatíveis com a pleuropneumonia. O *A. pleuropneumoniae* causa uma broncopneumonia necrótica hemorrágica com pleurite fibrinosa (CHIERS et al., 2002, 2010; VAZ; SILVA, 2004).

As principais lesões relacionadas à pleuropneumonia são observadas nos pulmões, pleura e pericárdio. As lesões normalmente são bilaterais e acometem os lobos apicais, mas podem ser unilaterais. As lesões pulmonares são delimitadas, escuras, focais e associadas à pleurite fibrinosa (COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004). A presença de aderência adjacente à área pulmonar e pleural acometida é uma das principais observações na inspeção durante o abate, assim como a presença de exsudato fibrinoso avermelhado (VAZ; SILVA, 2004).

2.2.1.5 Histopatologia

Pode-se visualizar uma broncopneumonia necro-hemorrágica ou purulenta junto à pleurite fibrinosa ou fibrino-hemorrágica (VAZ; SILVA, 2004).

2.2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da pleuropneumonia normalmente se dá por meio do conjunto histórico clínico, lesões macro e microscópicas e isolamento bacteriano como a maioria das doenças bacterianas (VAZ; SILVA, 2004).

O isolamento bacteriano tem de ser feito por meio de animais clinicamente infectados com sinais clínicos evidentes. As amostras isoladas normalmente são oriundas de lesões pulmonares, tonsilas e em menor quantidade outros locais do trato respiratório. O cultivo para posterior isolamento se dá por meio da utilização de um Agar suplementado com NAD visto que conforme já elucidado este agente necessita deste para que ocorra seu crescimento. Animais cronicamente infectados possuem seu isolamento dificultado que pode resultar em um falso negativo visto que outros agentes habitantes normais do trato respiratório inibem o seu crescimento (COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; VAZ; SILVA, 2004).

A sorologia de rebanho como ferramenta de diagnóstico é amplamente utilizada assim como para determinar a situação de imunidade do rebanho e dispersão da infecção. A ELISA é o mais utilizado pela sua rapidez e alta sensibilidade sendo possível identificar vários sorotipos e polissacarídeos (COELHO; VIEIRA-BRITO; RODRIGUES, 2004; VAZ; SILVA, 2004).

A biologia molecular por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) também realiza diagnóstico de alta sensibilidade detectando o gene A das exotoxinas que participam da virulência do *A. pleuropneumoniae* (VAZ; SILVA, 2004). A partir da amplificação do material genético encontrado nas

amostras analisadas é possível ter um resultado eficiente que elimina os falsos negativos que podem ser encontrados nos exames de sorologia (FERRAZ et al., 2010).

2.2.2 Pneumonia Enzoótica

A pneumonia enzoótica é uma doença respiratória bacteriana de grande importância nas granjas suínas de criação intensiva em todo o mundo. A doença é caracterizada clinicamente por sinais respiratórios, com evolução crônica associada à broncopneumonia supurativa (ECCO; LAZZARI; GUEDES, 2009). Esta doença leva a uma perda de produtividade de plantel e pode levar a condenação de carcaça no período de abate por suas sequelas (ALMEIDA et al., 2012; CARRIJO; NASCIMENTO; TORTELLY, 2008).

2.2.2.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

A pneumonia enzoótica é causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (ECCO; LAZZARI; GUEDES, 2009), uma bactéria pequena, pleomórfica, gram positiva com ausência de parede celular (SOBESTIANSKY et al., 2011). Devido a esta ausência de parede celular ela se torna resistente a vários antibióticos disponíveis no mercado tais como, penicilinas e cefalosporinas. Crescem lentamente sob condições de cultivo sendo necessário um meio específico denominado meio de Friis, a uma temperatura de 37 °C, pH 7,5 e uma atmosfera de 5 a 10% de dióxido de carbono (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006).

A bactéria possui uma alta capacidade de evadir o sistema imunológico de seu hospedeiro por ter a capacidade de mudar os seus antígenos de superfície devido à sequências de DNA repetidas em seu genoma e com isso também pode levar a uma ação imunodepressora que acaba resultando em um pré-disposição à

instalação de outros agentes microbiológicos (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006).

2.2.2.2 Epidemiologia

A pneumonia enzoótica é uma doença infecto crônica multifatorial que pode afetar de 70 a 100% dos animais de um único rebanho. Fatores de manejo e ambientais influenciam a presença e severidade da doença em um plantel, como superlotação, ventilação precária, mesclagem de lotes em baias de terminação, animais de diferentes origens sanitárias, entre outros (ASSUNÇÃO et al., 2005; VILLARREAL et al., 2011). Apesar de ser uma enfermidade que possui alta morbidade ela apresenta uma baixa mortalidade. Os animais geralmente apresentam uma tosse seca que se torna produtiva quando existe contaminação bacteriana secundária, febre, dificuldade respiratória após movimentação, perda de ganho de peso diário e um aumento na conversão alimentar (CARRIJO; NASCIMENTO; TORTELLY, 2008; CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006; ECCO; LAZZARI; GUEDES, 2009; VILLARREAL et al., 2011).

A transmissão do agente ocorre sobre condições de contato direto de secreções respiratórias de um animal acometido ou por aerossóis (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006). Os animais diagnosticados com micoplasmose ainda podem desenvolver uma broncopneumonia secundária pela colonização do trato respiratório por outros agentes bacterianos devido à imunossupressão (CARRIJO; NASCIMENTO; TORTELLY, 2008).

A vacinação é amplamente utilizada nos rebanhos industriais devido aos prejuízos de larga escala que esta doença causa, porém, as vacinas inativadas comerciais disponíveis para compra só conferem uma proteção parcial não impedindo a instalação do agente, nem a transmissão da doença, muito menos que um animal torne-se portador da mesma. Com a vacinação, no entanto, ocorre uma diminuição dos sinais clínicos, lesões pulmonares e uma melhoria da

conversão alimentar (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006; SIMIONATTO et al., 2012; VILLARREAL et al., 2011).

2.2.2.3 Patogenia

A virulência de diferentes cepas do *M. hyopneumoniae* determina a manifestação da doença clínica, cepas com maior potencial de virulência com sinais clínicos e lesões pulmonares severas ao contrário de cepas menos virulentas apresentam sinais clínicos e lesões pulmonares mais brandas (VILLARREAL et al., 2011).

A bactéria coloniza o epitélio respiratório, traqueia, brônquios e bronquíolos, tendo como consequência uma diminuição e perda da atividade ciliar e degeneração das células epiteliais (ECCO; LAZZARI; GUEDES, 2009). A diminuição e perda de atividade ciliar são de extrema importância, visto que o aparelho muco-ciliar é aquele que protege, ou seja, atua como uma primeira linha de defesa contra prováveis agentes microbiológicos. Sendo assim uma alteração neste levaria a uma diminuição desta proteção e conseqüentemente predispondo a colonização não só do micoplasma, mas de outros agentes também (ALMEIDA et al., 2012).

A patogenia da micoplasmose envolve a adesão, colonização, citotoxicidade, evasão da resposta imune do hospedeiro (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006). Na micoplasmose há a liberação de citocinas, como interleucinas 1e 6 e fator de necrose tumoral, que podem ser mais prejudiciais ao hospedeiro que o próprio agente. A quantidade de citocinas é maior em pulmões com lesões que em pulmões sem lesões (CHOI et al., 2006).

Algumas proteínas de membrana tais como 36-KD lactato desidrogenase, fator citotóxico 54-KD e lipoproteínas de membrana são ditas como fatores de virulência desta bactéria, porém, sua função exata ainda não foi totalmente determinada (CHOI et al., 2006).

2.2.2.4 Lesões ao Abate

A lesão macroscópica mais comumente observada ao abate são áreas demarcadas, vermelhas escuras a arroxeadas até tons acinzentados de consolidação crânio-ventral dos pulmões. Ao corte pode fluir exsudato purulento das vias aéreas, particularmente quando há infecções secundárias (ALMEIDA et al., 2012; CHOI et al., 2006).

2.2.2.5 Histopatologia

Durante a apresentação aguda da doença é possível observar na histologia uma perda da morfologia do epitélio ciliar como a degeneração de suas células assim como presença de neutrófilos e macrófagos no interior e adjacente às vias respiratória. Na fase crônica desta enfermidade observa-se uma hiperplasia dos acúmulos linfóides associados aos brônquios (BALT) sendo esta a principalmente característica microscópica relacionada a esta doença, embora também se observe o espessamento das bordas dos septos interalveolares (ALMEIDA et al., 2012; CHOI et al., 2006; ECCO; LAZZARI; GUEDES, 2009; REDONDO et al., 2009).

Existem colorações especiais que podem ser utilizadas na tentativa de visualizar a bactéria, tais como a coloração de Giemsa, dienes e azul de metileno. A coloração de Gram, normalmente utilizada para distinguir bactérias positivas de negativas, não possui um bom resultado quando empregada na identificação do *M. hyopneumoniae* (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006).

2.2.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico em geral se realiza pelo conjunto de dados, que inclui histórico clínico, lesões macro e microscópicas. A confirmação laboratorial do *M. hyopneumoniae* é feita normalmente por meio de cultivo e posteriormente

isolamento do agente, sendo também utilizados testes sorológicos para quantificar a titulação dos animais. Porém, a desvantagem destes métodos de cultivo e isolamento é o fato que o agente é considerado fastidioso e com um tempo de conclusão de técnica demorado podendo ainda ser dificultado pela presença de outras espécies de micoplasma naturais do trato respiratório suíno (ASSUNÇÃO et al., 2005).

A PCR também é uma técnica de diagnóstico amplamente utilizada que fornece resultados rápidos e com alta especificidade e sensibilidade (ASSUNÇÃO et al., 2005).

2.2.3 Micobacterioses

Suínos são animais susceptíveis a infecções por diversos microorganismos, tais como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* e outras micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium* (MAC). O termo tuberculose é utilizado para suínos apenas quando a enfermidade for causada por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, quando o agente causal pertence ao complexo MAC a enfermidade é classificada com micobacteriose (FERREIRA NETO; OLIVEIRA, 2008).

Animais infectados por *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* desenvolvem uma doença progressiva e as carnes desses animais acometidos oferecem riscos ao consumidor. Carcaças contaminadas por Complexo MAC também podem apresentar risco a saúde pública.

2.2.3.1 *Mycobacterium sp*

As micobactérias envolvidas na etiologia da doença em suínos foram agrupadas em dois complexos: *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e *Mycobacterium avium intracellulare scrofulaceum* (MAIS), sendo o primeiro composto principalmente pelo *M. tuberculosis* e *M. bovis* e o segundo por *M.*

avium, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*. O complexo MTC é responsável pela tuberculose clássica, no entanto os agentes do complexo MAIS são considerados como os principais causadores da linfadenite granulomatosa suína, detectados durante a inspeção sanitária nos abatedouros (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006). Aproximadamente 15 tipos de sorovares do complexo *M. avium* foram isolados em diversos países demonstrando a distribuição mundial das micobacterioses (THOEN et al., 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium* são álcool-ácido resistentes, aeróbios e imóveis, não formam esporos, possuem potencial zoonótico e cursam com o desenvolvimento de processos infecciosos crônicos com formação de reações granulomatosas típicas, conhecidos como “tubérculos” (CORRÊA; CORRÊA, 1992; QUINN et al., 2005). As micobactérias possuem parede celular impermeável composta por ácidos micólicos, responsáveis pela hidrofobicidade, crescimento lento, sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis e pela resistência a diversos desinfetantes (LARA et al., 2009; MIRANDA, 2010). São microrganismos ubíquos e euritêrmicos, que podem se desenvolver em diferentes valores de temperaturas e pH. O complexo MAIS possui maior taxa de crescimento em meios com pH entre 4,0 e 7,5, sendo os valores entre 5,4 e 6,5 ideais para o seu desenvolvimento. No entanto, as micobactérias podem ser destruídas pelo calor quando expostas a temperatura em torno de 65,5 °C por 10 minutos (LARA et al., 2009; MIRANDA, 2010).

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são altamente resistentes aos alcoóis, aos ácidos e à dissecação podendo sobreviver vários meses nas instalações dos animais e durante anos no solo (LARA et al., 2009; MIRANDA, 2010). Desinfetantes a base de hipoclorito de sódio, cresóis, fenóis e aldeídos apresentam boa ação bactericida sobre as micobactérias (MIRANDA, 2010; MORÉS; SILVA, 2001).

2.2.3.2 Epidemiologia

As micobactérias pertencentes ao complexo MAIS acometem uma ampla variedade de espécies domésticas, incluindo aves, bovinos, suínos, ovinos, caprinos, equinos e o homem (MIRANDA, 2010). Os suínos são susceptíveis à infecção pelo gênero *Mycobacterium*, com destaque para os agentes do complexo MAIS, sendo as espécies pertencentes ao complexo MTC mais patogênicas, diagnosticadas frequentemente em bovinos e humanos (CORRÊA et al., 2006; LARA et al., 2009). A via de transmissão das micobactérias é horizontal, por meio da ingestão de água de bebida, solo, ração contaminada, material de cama e pelo contato com outros animais infectados, como aves domésticas e silvestres, roedores e outros suínos infectados. Os animais acometidos na granja são considerados como importantes fontes de infecção, pois o agente é eliminado constantemente pelas fezes e urina, contaminando o ambiente e conseqüentemente outros suínos (MIRANDA, 2010; MORÉS; SILVA, 2001).

A linfadenite granulomatosa é considerada uma das principais enfermidades que cursam com grande impacto econômico na suinocultura, em função do alto prejuízo aos produtores pela condenação das carcaças (LARA et al., 2009). Os critérios para eliminação das carcaças acometidas estão relacionadas ao potencial zoonótico de vários agentes envolvidos na linfadenite suína, particularmente as bactérias do gênero *Mycobacterium* sp., mas também outras como o *Rhodococcus equi*, e pela impossibilidade de diferenciação das lesões macroscópicas, encontradas no abatedouro, causadas por outros agentes bacterianos com pouco ou nenhum risco zoonótico (LARA et al., 2009). Segundo Martins (2001), a perda econômica na suinocultura decorrente da linfadenite na região sul do Brasil foi estimada em 6,9 a 8,0 milhões de reais no ano de 1999, demonstrando o impacto negativo dessa doença para a produção de suínos na região.

A transmissão da micobacteriose e da rodococose para o homem pode ocorrer na granja no contato direto com suínos portadores e a partir do consumo de produtos e derivados de origem suína. Além disso, esses microrganismos estão sendo crescentemente isolados em pacientes humanos acometidos pela síndrome da imunodeficiência na adquirida (AIDS), aumentando o cuidado da vigilância sanitária em relação ao controle da linfadenite suína. Nesse contexto, a fiscalização sanitária durante diferentes fases da cadeia produtiva de carne, entre elas o abate, desempenha papel fundamental no controle de zoonoses para o homem (LARA et al., 2009).

2.2.3.3 Patogenia

A transmissão das micobactérias do complexo aviário ocorre por via oral. Após a ingestão, o agente penetra na mucosa do trato digestório, sendo posteriormente drenados para os linfonodos mesentéricos regionais. Ocasionalmente pode ocorrer disseminação do agente para os linfonodos mediastínicos, provavelmente por via digestiva, em função da drenagem linfática da porção torácica do esôfago (MORÉS; SILVA, 2001). Diferindo da infecção causada pelo *M. bovis*, que utiliza principalmente a via de infecção respiratória, afetando órgãos parenquimatosos, como os pulmões (THOEN et al., 2006).

As lesões presentes na linfadenite suína estão relacionadas com a capacidade de multiplicação do bacilo nos tecidos infectados e na indução de resposta tecidual pelo hospedeiro (THOEN et al., 2006). Inicialmente as micobactérias são atacadas por granulócitos e componentes humorais, no entanto, macrófagos ativados são considerados a linhagem de defesa mais importante para o hospedeiro contra o agente (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006).

Os bacilos possuem como fatores de virulência os constituintes da parede celular, composta de ácidos micólicos, fosfolipídios e sulfolipídios (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006). Segundo Thoen et al. (2006), a combinação desses componentes, liberados pelas micobactérias, interfere na formação do fagolisossomo e na ativação/liberação de enzimas lisossomais presentes no citoplasma dos macrófagos. Portanto, após a adesão bacteriana, os bacilos fagocitados pelos macrófagos produzem uma reação granulomatosa local, culminando com a proliferação de células inflamatórias. Os nódulos iniciais podem permanecer estacionários ou evoluir para áreas necróticas compostas por material caseoso (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006). O *Mycobacterium* spp. não produz toxinas ou enzimas conhecidas que atuem diretamente nos tecidos acometidos, sendo a resposta imune do hospedeiro a principal causa de acometimento tissular (MORÉS; SILVA, 2001).

2.2.3.4 Lesões ao Abate

A linfadenite granulomatosa suína é considerada assintomática, sendo as lesões presentes nas carcaças detectadas pelo serviço de inspeção de carnes no abatedouro. Na avaliação macroscópica *post-mortem* são comumente encontradas linfonodos cervicais e mesentéricos aumentados de tamanho e de consistência firme (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006).

O *M. avium* produz lesões granulomatosas proliferativas caseosas, de coloração branca amarelada, com tamanho variável desde pequenos focos milimétricos até lesões difusas por todo linfonodo acometido. Somente pela análise macroscópica é impossível diferenciar lesões causadas por micobactérias com lesões ocasionadas por outros agentes, entre eles o *Rhodococcus equi* (MORÉS; SILVA, 2001; THOEN et al., 2006).

2.2.3.5 Histopatologia

A utilização da histopatologia como ferramenta no diagnóstico permite a caracterização microscópica das lesões nos linfonodos acometidos. São observadas frequentemente proliferação de células epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langhans, necrose caseosa e calcificação distrófica, principalmente em lesões mais antigas (MIRANDA, 2010; MORÉS; SILVA, 2001). As micobactérias não são visíveis na coloração de rotina (hematoxilina e eosina), mas são evidenciadas nas lesões coradas pela da técnica de Ziehl-Neelsen, sendo denominadas por isto bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Essa coloração é determinada pela forte ligação da fucsina carbólica com lipídios presentes na parede celular da bactéria, não ocorrendo remoção pela descoloração com solução álcool-ácida (MIRANDA, 2010; QUINN et al., 2005).

2.2.3.6 Diagnóstico

O diagnóstico é realizado pelos achados macro e microscópicos. As micobactérias podem ser evidenciadas pela técnica de Ziehl-Neelsen, mas para a identificação das espécies do gênero *Mycobacterium* outras técnicas são necessárias. A imuno-histoquímica (IHQ), associada ao exame histopatológico, poderá fornecer um diagnóstico etiológico seguro e rápido. O isolamento bacteriano é a prova ideal para identificação específica, mas exige procedimentos especiais de laboratórios, demandando muito tempo para o crescimento das micobactérias, e possui ainda as desvantagens de ter baixa sensibilidade e alto custo de execução. Técnicas moleculares também têm sido empregadas para este fim (THOEN et al., 2006).

2.3 Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2)

O primeiro relato de circovírus foi feito há 25 anos descrevendo-o como um contaminante de uma cultura celular de células renais de suíno. Ao longo dos anos começaram surgir relatos correlacionando o vírus a condições clínicas, porém, os isolados encontrados possuíam estrutura genômica e antigênica diferente daquele encontrado na cultura de células renais. Assim, o vírus contaminante de cultura de células foi denominado circovírus suíno tipo 1 (não patogênico) e o responsável pelas condições clínicas, circovírus suíno tipo 2 (ALLAN; ELLIS, 2000).

2.3.1 Circovírus suíno tipo 2

O circovírus suíno tipo 2 é classificado na família *Circoviridae*, sendo um vírus pequeno, não envelopado, DNA fita simples associado a enfermidades que causam lesões principalmente em tecidos linfoides e imunossupressão do animal acometido (ALLAN; ELLIS, 2000; CORREA et al., 2006; FENAUX et al., 2002; FERNANDES et al., 2006; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005). No seu genoma já é conhecido a sequencia de 3 fases de leitura (ORFs) estas além de possuir papel de replicação viral e estrutural ainda possui uma proteína que é responsável pela indução da apoptose celular (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007). O PCV2 é estável ao pH 3, a temperaturas de 56 °C a 70°C, ao ressecamento, ao aquecimento, à alta umidade e a desinfetantes comuns, mas sendo inativado por desinfetantes alcalinos, agentes oxidantes e amônia quaternária (LOPES, 2009).

2.3.2 Epidemiologia

A principal enfermidade associada ao vírus é a síndrome multissistêmica do definhamento. Esta foi primeiro relatado em 1991 sendo considerada uma

doença emergente em suínos (FENAUX et al., 2002). A síndrome multissistêmica do definhamento se manifesta na forma de diminuição progressiva de perda de peso, dispneia, taquipneia, pneumonia intersticial e linfadenopatia. Pode acometer animais das mais diversas categorias, porém, é predominante nas categorias de creche e engorda, possuindo morbidade e mortalidade de 80% e 40%, respectivamente (FENAUX et al., 2002; FERNANDES et al., 2006; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

Considerado um vírus ubíquo a sua transmissibilidade pode ser tanto de forma vertical quanto horizontal, sendo a via oronasal a mais frequente. Existem outras vias de infecção tais como a intranasal e subcutânea, porém, essas somente foram confirmadas experimentalmente. Sendo observada a excreção do vírus nas fezes até 13 dias após infecção (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005; SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

A circovirose apesar de que não apresenta potencial zoonótico, causa uma imunodepressão que leva ao animal acometido uma predisposição a infecções secundárias por agentes oportunistas, aumentando a utilização de antibióticos o que também acarreta prejuízos econômicos para o produtor e para a indústria (CORRÊA et al., 2006; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005).

2.3.3 Patogenia

A patogenia do circovírus suíno tipo 2 está principalmente associada a alteração do sistema imune por meio da depleção de linfócitos B e T aumentando-se a quantidade de monócitos e macrófagos nos tecidos, e um padrão de resposta de citocinas alterado, por exemplo o circovírus provoca uma resposta da interleucina 10 em células mononucleares periféricas (KEKARAINEN et al., 2008).

2.3.4 Lesões ao abate

No abate não existe presença de uma lesão patognomônica característica da circovirose. Normalmente observa-se carcaça aparentemente com escore menor e com presença dos linfonodos aumentados de tamanho, principalmente os inguinais. Pode observar também a presença de alguma afecção respiratória concomitante visto que a circovirose é considerada uma doença debilitante e imunodepressora (SOBESTIANSKY; BARCELLOS, 2007).

2.3.5 Histopatologia

As lesões histológicas normalmente observadas são depleção de linfócitos B e T associada à presença de macrófagos e presença de células gigantes (SOUZA et al., 2008).

2.3.6 Diagnóstico

O diagnóstico é feito baseado em lesões histológicas em órgãos linfoides tais como, linfonodos, baço e timo, associado à quantidade de vírus presente nas lesões. Visto que técnicas moleculares como, a reação em cadeia pela polimerase é mais sensível, porém, sua resposta diagnóstica com o circovirose não é ideal. A imuno-histoquímica é a técnica ideal para detecção de antígenos e diagnóstico definitivo da circovirose visto que o diagnóstico é necessário a presença do vírus associado à doença clínica (SOUZA et al., 2008).

2.4 Importância da inspeção das linfadenites infecciosas de suínos na saúde pública

A inspeção *ante-mortem* dos animais já permite que sejam individualizados aqueles animais que podem estar doentes dos aparentemente saudáveis sendo que esses podem ter lesões ou sequelas de infecções que

somente poderão ser detectadas durante a inspeção das vísceras e da carcaça (HURD et al., 2008).

O monitoramento em abatedouros pode permitir ao veterinário realizar um levantamento de dados para estudar um determinado agente, a lesão causada por este, a sua incidência e o seu impacto econômico, assim como na saúde pública (ALBERTON; MORES, 2008; SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2011).

A importância das infecções ocupacionais também deve ser considerada visto que muitos agentes que podem estar presentes tanto na granja quanto na linha de inspeção podem causar doenças nas pessoas envolvidas no processo de produção. Muitas dessas infecções ocorrem por ingestão, inalação, por contato direto ou indireto com animais doentes e seus fluidos fisiológicos (CARDOSO, 2009; FERNANDES et al., 2006). As medidas de sanidade e segurança que são adotadas tanto nas granjas quanto nos frigoríficos permitem reduzir, mas não extinguir estes riscos. Tais medidas incluem sistemas de vazios sanitários, vacinações, recebimento de animais de origem conhecida portadores de atestados sanitários adequados, a utilização de equipamentos de proteção individual (toucas, luvas, máscaras) e controle de entrada e saída de funcionários nas áreas do frigorífico, pocilgas, área suja, área limpa, refrigeração, desossa (CARDOSO, 2009).

Apesar da grande diversidade de agentes que podem ser encontrados em linfonodos e causar a linfadenites, há muitas semelhanças entre as lesões macroscópicas. A existência de potencial zoonótico em algumas destas infecções demonstra a necessidade de um diagnóstico rápido e seguro. Porém, a confirmação do diagnóstico para esses agentes é muitas vezes demorada, com a utilização de exames de baixa sensibilidade e alto custo de execução no qual indica que a linfadenite nessa espécie seja considerada um problema sanitário por sua dificuldade diagnóstica (LARA et al., 2009; MORÉS et al., 2007). A rapidez na confirmação laboratorial do diagnóstico permite que a destinação das

carcaças seja feita de forma mais adequada podendo haver um melhor aproveitamento da carcaça em seu potencial máximo.

2.5 Teste Imuno-histoquímico

A imuno-histoquímica surgiu com pesquisas sobre a imunopatologia no meados da década de 40 (WERNER et al., 2005). A técnica é usada como ferramenta de diagnóstico na patologia humana desde a década de 70, sendo gradativamente introduzida na rotina de diagnóstico veterinário (RUIZ et al., 2005).

O fundamento da imuno-histoquímica é a demonstração de antígenos presentes em tecidos e células por meio de anticorpos. A necessidade cada vez crescente de especificidade e sensibilidade torna a técnica simples mais complexa (RAMOS-VARA, 2005).

Os anticorpos usados na técnica dependerão do antígeno em questão, porém, seja qual for o antígeno a imunoglobulina mais utilizada é a IgG. A estrutura de uma imunoglobulina é determinada por duas cadeias idênticas sendo uma pesada e uma leve, e uma porção chamada Fc. Esta última porção que proporcionará a ligação e coloração de fundo na imunoistoquímica (RAMOS-VARA, 2005).

Existem dois tipos de anticorpos utilizados na técnica os monoclonais e os policlonais. Os anticorpos monoclonais são aqueles produzidos de um único clone de linfócito B parenteral normalmente de camundongos, a partir dele são produzidos as cópias de anticorpo. Os anticorpos policlonais são aqueles produzidos por diversos clones de linfócitos B, frente à imunização com determinado antígeno. Estes podem ser produzidos em diversas espécies animais, sendo as mais comumente utilizadas, coelhos, caprinos e camundongos. Sendo direcionados a diferentes epítomos, os anticorpos policlonais possuem

maior afinidade e reatividade, porém, menor especificidade quando comparados com os monoclonais (RAMOS-VARA, 2005).

Além da escolha do tipo de anticorpo a ser utilizado, a recuperação antigênica também é um quesito importante para a técnica. Vários métodos hoje são utilizados na recuperação antigênica tais como vapor úmido (panela de pressão e banho-maria), calor irradiado por microondas e digestão enzimática (NONOGAKI et al., 2007).

A interação antígeno-anticorpo não pode ser vista sobre microscopia óptica a não ser que essa interação seja marcada. Essa marcação baseia-se na ligação primária, secundária ou até terciária ao anticorpo utilizado.

Vários marcadores são utilizados como substâncias fluorescentes, tais como metais e enzimas. Os mais utilizados são as enzimas. Além disso, a marcação pode ser direta ou indireta.

A marcação direta é rápida e utiliza a marcação do próprio anticorpo primário utilizado. Essa é feita com fluorocromos, enzimas e biotina. A marcação indireta se baseia na marcação de um anticorpo secundário que se encontrará ligado ao complexo antígeno-anticorpo (RAMOS-VARA, 2005). Um dos métodos indiretos mais comumente utilizados é a avidina-biotina.

A avidina é uma glicoproteína extraída da clara de ovo, possuindo 4 sítios de ligação. A biotina é uma vitamina de baixo peso molecular que possui um sítio de ligação com a avidina. Juntas possuem uma alta sensibilidade capaz de se ligar ao complexo antígeno-anticorpo (RAMOS-VARA, 2005).

A imunohistoquímica associada ao exame histopatológico tem sido empregada no diagnóstico etiológico rápido e confiável das micobacterioses. Embora a coloração de Ziehl-Neelsen evidencie as micobactérias na lesão, esta não faz a distinção entre espécies e ainda somente demonstrará aquelas bactérias cujas paredes celulares estão intactas. A imunohistoquímica poderá evidenciar antígenos micobacterianos livres, fragmentos celulares e microrganismos com

alterações de parede celular tornando essa técnica mais sensível e ideal para a caracterização etiológica da doença (MORÈS et al., 2007). A imunohistoquímica também tem se mostrado uma ferramenta importante no diagnóstico para circovirose suína, permitindo a associação da presença de antígenos virais com lesões teciduais (KIM; CHAE, 2004).

2.6 Processamento em Micro-ondas

O aparelho de micro-ondas foi inventado por Percy Spencer na década de 40. Desde então sendo amplamente utilizado no processamento de alimentos, além nas indústrias químicas e farmacêuticas. Os primeiros relatos da utilização do micro-ondas para a fixação de tecidos no processamento histológico foi na década de 70 com Mayers (NAIK et al., 2012; ROHR et al., 2001). Mas somente na década de 80 que por meio dos pesquisadores Kok, Boon e Leong que este começou a ser utilizado na fixação e processamento histológico de tecidos (KANGO; DESHMUKH, 2011).

A relativamente recente aplicação da irradiação de tecidos com micro-ondas para o processamento tem trazido avanços em termos de redução do tempo para obtenção dos cortes, os quais mantêm histomorfologia comparável à do processamento convencional sendo possível a avaliação histopatológica em cerca de 4 horas após colheita da amostra. Além disto, obtêm-se vantagens em relação à preservação de antígenos e ácidos nucleicos (ABREU et al., 2012; HAJAJEE; LEONG, 2004; KOK; BOON, 2003; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006).

Apesar de vários artigos demonstrarem as vantagens do processamento de tecidos em micro-ondas para histopatologia, o seu uso tem sido grandemente restrito a laboratórios voltados à patologia cirúrgica humana, onde é fortemente preconizado um diagnóstico rápido visto que isto possibilita que o paciente seja encaminhado ao tratamento mais adequado em menor tempo, reduzindo assim o

tempo que o mesmo ficaria nas dependências de um hospital e reduziria custos de atendimento (BUESA, 2007; NAIK et al., 2012; ROHR et al., 2001).

Outra vantagem do processamento em micro-ondas é a possibilidade de exclusão de reagentes de maior toxicidade, como o xilol e formol, do processamento tecidual. Em vários laboratórios de patologia humana este tipo de processamento vem sendo empregado na rotina de diagnóstico com excelentes resultados (HAFAJEE; LEONG, 2004; KOK; BOON, 2003; MORALES et al., 2002; NAIK et al., 2012).

O funcionamento do micro-ondas convencional possui algumas particularidades diferentes de outras formas convencionais de aquecimento. Em uma forma mais simples a geração de calor oriundo da energia do micro-ondas acontecerá a partir da agitação das moléculas no interior da amostra processada, com isso o aquecimento da mesma se dará de dentro para fora (CLARK; FOLZ; WEST, 2000; MUNKHOLM; TALMAN; HASSELAGER, 2008).

Durante o processamento em micro-ondas certos meios são utilizados para otimizar o tempo do processamento, tais como formol, álcool e parafina, porém, o tipo de álcool utilizado é diferente do álcool utilizado no processamento convencional, normalmente utiliza-se alcoóis com pontos de ebulição superiores aos de graduação convencional utilizadas, para que possa ocorrer o aquecimento sem que o meio entre em ebulição e teoricamente evapore ou cozinhe o tecido (ROHR et al., 2001).

A diminuição do tempo de processamento é alcançada também pela substituição de alguns dos solventes utilizados durante o processamento e a utilização do calor para diminuir o tempo de cada etapa. Utilizando substratos com menos toxicidade e que possuem pontos de ebulição superiores para aperfeiçoar a eficiência do processamento sendo que durante o processamento as substâncias são aquecidas até abaixo do seu ponto de ebulição permitindo um maior aproveitamento da mesma (ROHR et al., 2001). Sendo que o calor acelera

a penetração inicial do substrato no tecido e sua difusão, melhorando assim os tempos de processamento, isso é feito devido que a fórmula da difusão acusa que a distância média ao quadrado que uma partícula de solvente alcança em solução é proporcional ao tempo de difusão, ou seja, quanto menor a espessura da amostra em questão maior é a velocidade de difusão (KANGO; DESHMUKH, 2011). O papel do calor durante o processamento é acelerar a difusão dos solventes, diminuindo sua viscosidade permitindo uma maior penetração desses por meio da agitação das moléculas polares da amostra processada (KOK; BOON, 2003).

Sob o ponto de vista físico o processamento se dá por meio de 4 partes chaves, calor, difusão, viscosidade e penetração. Simplificando, o aumento de temperatura de um meio de processamento acelera sua difusão para o interior da amostra porque o calor diminui a viscosidade do meio utilizado isso que permite uma maior ou menor penetração do meio no tecido ou amostra. Além disso, amostras diferentes, de composições teciduais diferentes também influenciarão o processamento por meio de suas propriedades dielétricas. Exemplificando podemos usar a seguinte relação frequências mais elevadas do micro-ondas associadas a valores de propriedades dielétricas superiores resultam em apenas um aquecimento da superfície da amostra, em contrapartida baixas frequências e valores inferiores de propriedade dielétricas resultam em um aquecimento mais uniforme, no todo (CLARK; FOLZ; WEST, 2000; KANGO; DESHMUKH, 2011; NAIK et al., 2012).

O processamento neste caso realizado no micro-ondas doméstico é afetado pelas características físicas do micro-ondas, ou seja, ele possui uma distribuição desuniforme de energia ou densidade de radiação devido a fenômenos de reflexão, interfase e ressonância no seu interior. O formato do recipiente utilizado durante as etapas também influencia o processamento, a utilização de um recipiente cilíndrico age como uma lente de gera pontos focais

de aquecimento concentrando o calor, podendo provocar áreas de cozimento que não permitem a leitura e conseqüentemente o diagnóstico. O micro-ondas convencional possui áreas quentes e frias que são constantemente alteradas dependendo das características do material a ser processado, do solvente e do recipiente utilizado, logo certas etapas e certos locais podem não ser otimizadas 100% na temperatura e tempo pré-determinado. É necessário considerar sempre que a profundidade de penetração de uma onda de energia irá depender das propriedades dielétricas da amostra e material utilizado (CLARK; FOLZ; WEST, 2000; KANGO; DESHMUKH, 2011; NAIK et al., 2012; ROHR et al., 2001).

REFERÊNCIAS

ABREU, C. C. et al. Domestic microwave processing for rapid immune histochemical diagnosis of bovine rabies. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 27, n. 9, p. 1227-1230, Sept. 2012.

ALBERTON, G. C.; MORES, M. A. Z. Interpretação de lesões no abate como ferramenta de diagnóstico das doenças respiratórias dos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n. 1, p. 95-99, 2008. Supplement.

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 12, n. 3, p. 3-14, 2000.

ALMEIDA, P. R. et al. Nested-PCR for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial alveolar swabs, frozen tissues and formalin-fixed paraffin-embedded swine lung samples: comparative evaluation with immunohistochemical findings and histological features. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 8, p. 715-720, ago. 2012.

ASSUNÇÃO, P. et al. The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria, Spain. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 29, n. 6, p. 453-462, 2005.

BALIAN, A. C. et al. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 391-397, 1997.

BUESA, R. J. Microwave-assisted tissue processing: real impact n the histology workflow. **Annals of Diagnostic Pathology**, Philadelphia, v. 11, p. 206-211, 2007.

CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos? **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. 81-89, 2009. Supplement.

CARRIJO, K. F.; NASCIMENTO, E. R.; TORTELLY, R. Porcine enzootic pneumonia: relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 439-443, 2011.

CHIERS, K. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection patterns and serological profiles. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, p. 343-352, 2002.

_____. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 47, n. 5, 2010.

CHOI, C. et al. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 134, p. 40-46, 2006.

CLARK, D. E.; FOLZ, D. C.; WEST, J. K. Processing materials with microwave energy. **Materials Science and Engineering**, Lausanne, p. 153-158, 2000.

COELHO, A. C.; VIEIRA-BRITO, F. J.; RODRIGUES, J. Pleuropneumonia suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*: diagnóstico e estratégias de controle. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Coimbra, v. 99, n. 552, p. 193-198, 2004.

CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 1034-1042, maio/jun. 2006.

CORRÊA, A. M. R. et al. Aspectos clínicos-patológicos à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2006.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, 1992. 335 p.

COSTA, M. M. da et al. Aspectos fenotípicos, genotípicos e de diagnóstico da bactéria *A. pleuropneumoniae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1305-1313, jul./ago. 2004.

DECUADRO-HANSEN, G.; WERLANG, J.; WOLLMANN, E. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: uma nova visão no diagnóstico. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p. s157-s164, 2009. Supplement.

ECCO, R.; LAZZARI, A. M.; GUEDES, R. M. C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 461-468, 2009.

FENAUX, M. et al. Cloned genomic dna of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 2, p. 541-551, 2002.

FERNANDES, L. T. et al. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado no Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 1-8, 2006.

FERRAZ, M. I. C. P. et al. Detecção direta de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em órgãos de suídeos de Estado de São Paulo pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (nested-pcr). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 143-148, 2010.

FERREIRA NETO, J. S.; OLIVEIRA, E. M. D. Tuberculose e micobacterioses suínas. **Caderno Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 82-86, 2008.

HAFAJEE, Z. A. M.; LEONG, A. S. Y. Ultra-rapid microwave-stimulated tissue processing with a modified protocol incorporating microwave fixation. **Pathology**, Sussex, v. 36, n. 4, p. 325-329, 2004.

HURD, H. S. et al. Swine health impact on carcass contamination and human foodborne risk. **Public Health Reports**, Rockville, v. 123, p. 343-351, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Acesso em: 24 jun. 2013.

KANGO, P. G.; DESHMUKH, R. S. Microwave processing: a boon for oral pathologists. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, Mumbai, v. 15, n. 1, 2011.

KEKARAINEN, T. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 124, p. 41-49, 2008.

KIM, J.; CHAE, C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 16, p. 45-50, 2004.

KOK, L. P.; BOON, M. E. **Microwave for the art of microscopy**. Leiden: Coulomb Press Leyden, 2003. 163 p.

KOMIJIN, R. E. et al. Granulomatous lesions in lymph node of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 120, p. 352-357, 2007.

LARA, G. H. B. et al. Linfadenite infecciosa em suínos: etiologia, epidemiologia e aspectos em saúde pública. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 317-325, abr./jun. 2009.

LOPES, J. A. C. **Estudo de circovirose em explorações extensivas de suínos**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

MAES, D. et al. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2,3 and 9 in slaughter pigs from farrow to finish pig herds. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 32, p. 409-419, 2001.

MARSTELLER, T. A.; FENWICK, B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. **Swine Health and Production**, Perry, v. 7, n. 4, p. 161-165, 1999.

MARTINS, L. S. et al. Estudo da sazonalidade das micobacterioses em suínos no sul do Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 143-146, 2004.

MIRANDA, C. I. S. **Diagnóstico de micobacterioses em suínos abatidos para consumo por técnicas histopatológicas e de biologia molecular**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

MORALES, A. R. et al. Continuous-specimen-flow, high-throughput, 1-hour tissue processing. a system for rapid diagnostic tissue preparation. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 126, p. 583-590, May 2002.

MORÉS, N. et al. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do complexo *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 13-17, jan. 2007.

MORÉS, N.; SILVA, V. S. **Micobacterioses dos suínos: Linfadenite tuberculóide.** Brasília: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa /sgc/sgc_publicacoes/cot228.pdf>. Acesso em: 29 out. 2011.

MUNKHOLM, J.; TALMAN, M.; HASSELAGER, T. Implementation of a new rapid tissue processing method: vantagens and challenges. **Pathology Research and Practice**, Stuttgart, v. 204, p. 899-904, 2008.

NAIK, S. K. et al. Comparison of clarity of nucleocytoplasmic differentiation of oral tissues processed by microwave and conventional methods. **Annals of Diagnostic Pathology**, Philadelphia, v. 16, p. 128-133, 2012.

NONOGAKI, S. et al. Análise de indicadores internos e externos relevantes à resolutividade diagnóstica em laboratório de referência em imuno-histoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 297-403, 2007.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005. 114 p.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of imunoistochemistry. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

REDONDO, E. et al. Histopathological and immunohistochemical findings in lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 140, p. 260-270, 2009.

ROHR, R. L. et al. Quality of histologic sections and advantages of microwave processing. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 115, p. 703-708, 2001.

RUIZ, F. S. et al. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 263-270, 2005.

SANCHEZ-VASQUEZ, M. J. et al. The British pig health schemes: integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring. **Veterinary Record**, London, v. 169, n. 16, 2011.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.

SIMINIONATO, S. et al. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 35, p. 209-116, 2012.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cànone, 2007. 768 p.

SOBESTIANSKY, J. et al. Custo de um surto de *Mycoplasma hyopneumoniae*: relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 5, n. 2, p. 1-4, 2011.

SOUZA, K. K. et al. Reação em cadeia de polimerase (PCR) baseado no gene cpx para detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos naturalmente

e experimentalmente infectados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1954-1960, jul. 2008.

SURI, V. et al. Application of domestic microwave for urgent histopathology reporting: an evaluation. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, New Delhi, v. 49, n. 3, p. 348-351, July 2006.

THOEN, C. O. et al. **Diseases of swine**. 9th ed. Ames: Blackwell, 2006. 816 p.

VAZ, C. S. L.; SILVA, S. C. Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 635-643, 2004.

VILLARREAL, I. et al. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, p. 1731-1735, 2011.

WERNER, B. et al. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 5, p. 353-364, 2005.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO

(Este artigo será submetido à revista *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*)

PROCESSAMENTO DE TECIDOS EM MICRO-ONDAS PARA O DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO RÁPIDO DE LESÕES EM LINFONODOS EM SUÍNOS NA INSPEÇÃO SANITÁRIA.**RAPID TISSUE PROCESSING IN MICROWAVES FOR HISTOPATHOLOGIC DIAGNOSIS OF SWINE LYMPH NODE LESIONS DURING SANITARY INSPECTION.**

Joana R. Paglis^{1*}, Débora R. Orlando¹, Priscila R. F. Lopes¹, Rafael C. Costa¹, Mary S. Varaschin¹, Djeison L. Raymundo¹, Pedro S. Bezerra Jr¹.

¹Setor de Patologia Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil.

[*jojorpaglis@yahoo.com.br](mailto:jojorpaglis@yahoo.com.br)

RESUMO

A inspeção sanitária presta um importante papel de garantir a saúde da carne que chega a mesa do consumidor assim como fornece ao produtor informações importantes para que este possa saber o real estado sanitário de seu rebanho. Para que esta seja feita de forma eficiente é necessário que as monitorias patológicas associadas sejam realizadas em menor tempo para otimizar o tempo entre carcaça retida e destino final. O processamento em micro-ondas pode fornecer auxílio neste sentido por possibilitar redução no tempo para o diagnóstico histopatológico. O presente trabalho foi realizado com os objetivos de verificar a aplicação de um protocolo de processamento de tecidos em micro-

ondas associada a inspeção sanitária e compará-lo com o processamento convencional assim como avaliar a qualidade dos cortes histológicos para diagnóstico. Este estudo demonstrou que o processamento em micro-ondas é uma opção que pode ser utilizado como auxílio a inspeção sanitária uma vez que não houve diferenças significativas em relação ao processamento convencional, em termos de diagnósticos obtidos e na morfologia dos cortes analisados. As limitações do processamento observadas no presente estudo foram relacionadas principalmente a menor intensidade de coloração pela hematoxilina e eosina e a menor detecção de antígenos do circovírus.

Palavras chave: Micro-ondas; Linfonodo; Circovírus tipo 2; Imuno-histoquímica; Frigorífico;

ABSTRACT

Sanitary inspection plays an important role ensuring the quality of the meat purchased by the consumer as well as provides important information to the producers so they will know the actual health status of their herd. For this to occur efficiently it is necessary that pathological monitoring be accomplished in minimal time to optimize the between a carcass being retained and its final destination. Microwave tissue processing provides the solution decreasing diagnostic time. The present study was fulfilled with the goal to verify the efficiency of the microwave tissue processing associated to sanitary inspection and compare it to conventional tissue processing as well as evaluate the quality of the microscopic slides utilized for diagnosis. This study showed the microwave tissue processing may be utilized as a technique helping sanitary inspection in abattoirs, since there was no statistical difference when compared the diagnosis obtained and morphology of the slides analyzed. The limitations of this methodology observed in the present study were mainly related to the

diminished staining intensity of the Hematoxylin and Eosin and the diminished detection of circovirus antigens.

Key words: Microwave; Sanitary Inspection; Lymph node; Swine; Histopathology;

INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é o quarto maior produtor de carne suína do mundo, com uma produção de 863.825 mil toneladas em 2012, sendo o estado de Minas Gerais responsável por 19,2% do total desta (IBGE, 2013). A inspeção sanitária, por meio de monitorias patológicas em abatedouros, é crucial para avaliar a saúde do rebanho comercializado, contribuindo para garantir segurança em termos de saúde pública e ainda para gerar uma maior valorização do produto final (SANCHEZ-VASQUEZ et al., 2011).

A linfadenite é uma importante afecção que afeta a suinocultura no Brasil e no mundo, causando alto prejuízo econômico com a condenação de carcaças (LARA et al., 2009). Dentre os agentes infecciosos envolvidos com as linfadenites de suínos, destacam-se vários agentes bacterianos, como os do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium bovis*, *Rhodococcus equi* e *Streptococcus* β -hemolítico, *Staphylococcus* sp., *Nocardia* sp., *Streptococcus* sp., *Arcanobacterium pyogenes*, e virais, como circovírus suíno (BALIAN et al., 1997, MORÉS et al., 2007; LARA et al., 2009).

A histopatologia e a imuno-histoquímica têm sido empregadas como importantes técnicas de auxílio no diagnóstico de lesões em linfonodos de suínos no abatedouro em diversos artigos (KOMIJN et al., 2007; MORÉS et al., 2007). Tais técnicas têm fornecido um diagnóstico seguro, permitindo a tomada de decisão em relação à destinação da carcaça (MORÉS et al., 2007). Entretanto, uma das limitações destas técnicas é tempo necessário para o processamento dos tecidos. Neste sentido, a relativamente recente aplicação da irradiação de tecidos

com micro-ondas para o processamento histopatológico tem trazido avanços em termos de redução do tempo para obtenção dos cortes, além de vantagens em relação à preservação de antígenos e ácidos nucleicos (BOON et al., 1986; HAJAJEE; LEONG, 2004; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006). Estudos qualitativos dos cortes histológicos obtidos por meio do processamento em micro-ondas são escassos, restringindo-se a patologia humana (KANGO & DESHMUKH, 2011). Tal fato demonstra a necessidade de estudos com este enfoque na medicina veterinária.

O objetivo do presente trabalho é avaliar a utilização do processamento rápido em micro-ondas para o diagnóstico histopatológico de carcaças desviadas ao departamento de inspeção final. Será verificado se existem diferenças nos diagnósticos obtidos de linfonodos e carcaça entre as avaliações macroscópicas e microscópicas, após o processamento convencional e em micro-ondas, e na qualidade das lâminas obtidas em ambos os processamentos. Será realizada também uma análise imuno-histoquímica para averiguar a detecção de antígenos do circovírus nos linfonodos que microscopicamente apresentarem depleção linfoide em ambos os processamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados fragmentos de linfonodos (submandibular, esternal cranial, mediastínico, ilíaco e inguinal) de carcaças desviadas pelo serviço de inspeção federal em um frigorífico localizado no município de Lavras – MG, no período de março a setembro de 2012. Os fragmentos foram mantidos em formol a 10% tamponado com fosfatos e posteriormente encaminhados para o Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA para processamento histológico.

Processamento Convencional

Após a fixação em formol por 24 a 48h o material coletado foi clivado, desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol e

incluído em parafina. Fragmentos foram cortados a 5 μ m e corados pela hematoxilina e eosina (HE). A desidratação, diafanização e infiltração de parafina nos tecidos foram realizados conforme preconizado por PROPHET et al. (1995), perfazendo um tempo total de 14 horas.

Processamento em micro-ondas

Para processamento com micro-ondas, fragmentos de 5 mm de espessura foram pré-fixados em formol a 10% tamponado com fosfatos por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação (Agitador Kline, CT-150, Cientec®). Após este período, os fragmentos foram clivados com 3 mm de espessura, imersos em formol a 10% tamponado na proporção de uma parte de tecido para nove de formol e irradiados em micro-ondas doméstico (NN-S65B, Panasonic®) por um minuto na potência máxima (100%). Em seguida, os mesmos foram irradiados na mesma solução por um minuto e meio na potência mínima (10%) (KAHVECI; ÇAVUSOGLU; SIRMALI, 1997).

Após a fixação, os tecidos foram desidratados e diafanizados no micro-ondas. Para desidratação os tecidos foram imersos em álcool etílico absoluto e irradiados por 4 minutos na potência de 50%. Para diafanização os tecidos foram imersos em álcool isopropílico e irradiados por 4 minutos na potência de 50%. A proporção utilizada nos alcoóis foi de uma parte de tecido para nove partes de álcool. Para embebição os tecidos foram imersos em parafina histológica derretida na proporção de uma parte de tecido para cinco partes de parafina e irradiados por 7 minutos na potência de 80%. Um vasilhame contendo 200 ml de água foi colocado junto no micro-ondas durante a embebição (BOON et al., 1986; SURI et al., 2006). Após a inclusão em parafina, foram realizados cortes de 5 μ m aderidos em lâminas com gelatina para coloração de HE.

Imuno-histoquímica

As amostras de linfonodos que na histopatologia apresentaram depleção linfoide foram submetidas à imuno-histoquímica para circovirose conforme o

protocolo pré-estabelecido (SORDEN et al., 1999; CORREA et al., 2006). Destas foram realizados cortes de 4 µm de espessura em lâminas contendo Silane®, secadas em estufa a 60°C por 20 minutos. Estes cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool etílico até a água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi feita com 0,05% de protease XIV (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) durante 15 minutos. Para o bloqueio das ligações inespecíficas (“background”), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico, Nestlé®) 5% durante 1 hora. Os cortes foram cobertos com solução contendo o anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-PCV2, SORDEN et al., 1999) na diluição de 1:1000 em PBS (*phosphate buffered saline*), em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após utilizou-se o anticorpo secundário biotilado (DAKO LSAB 2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA) durante 20 minutos. Em seguida os cortes foram tratados com estreptavidinaperoxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA) por mais 20 minutos, e revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Diaminobenzidina, DAKO Corp., Carpinteria, CA). Foi inserida em cada imuno-histoquímica, um controle negativo (Amostra sem presença de anticorpo) e como controle positivo será utilizados um corte histológico de linfonodo positivo para o PCV2.

Análise qualitativa dos cortes histológicos

Na avaliação de qualidade das lâminas foi observado se houve possibilidade de realizar a leitura das lâminas obtidas no processamento rápido em micro-ondas e quantas dessas lâminas possuíam alterações morfológicas que permitiram leituras parciais das mesmas. Foi determinado como lâminas que permitiram leitura aquelas que não possuíam nenhuma alteração no corte por problemas de fixação ou por fragmentação do tecido.

Foi realizado um ensaio cego para avaliação de qualidade comparativa da morfologia celular, nuclear e de coloração dos processamentos utilizados. Foram sorteados ao acaso duas coletas de cada mês do período experimental e dentro dessas duas coletas também foram sorteados dois linfonodos para serem submetidos às mesmas etapas de coloração para posteriormente serem avaliados. Esta avaliação foi realizada por meio de uma leitura subjetiva realizada por sete patologistas. A metodologia foi baseada em estudo realizado por Kango & Deshmukh (2011), com adaptações. Os critérios utilizados na avaliação morfológica e de coloração seguem abaixo.

- Morfologia Celular:

Distinta: Presença de contraste núcleo/citoplasma, distinção de células inflamatórias se presente, ausência de lise de hemácias e distinção de tecido conjuntivo.

Indistinta: Ausência dos itens anteriores.

- Morfologia Nuclear:

Distinta: Condensação de cromatina se presente, visualização de nucléolo, visualização de figuras de mitose se presente e membrana nuclear visível.

Indistinta: Ausência dos itens anteriores.

- Coloração:

Fraca: Coloração desigual, presença de artefatos e áreas sem coloração.

Satisfatória: Não marca detalhes, porém, permite diagnóstico.

Boa: Rico em detalhes, coloração uniforme e permite diagnóstico.

O teste qui-quadrado foi utilizado na análise dos dados ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$) pelo programa Epi Info 7.1.0.6.

RESULTADOS

No período de março a setembro foram abatidos 33.371 mil suínos, sendo que 555 carcaças foram desviadas ao departamento de inspeção final por motivos patológicos e não patológicos. Estes últimos eram contusão, escaldagem excessiva, contaminação com fezes, entre outros. O destino das carcaças foi determinado conforme o diagnóstico macroscópico dado pelo veterinário responsável pela inspeção e alguns suínos receberam mais de um diagnóstico. No frigorífico em questão apenas três destinações eram possíveis, assim das 555 carcaças, 365 foram liberadas, 52 foram destinadas a embutidos cozidos e 138 foram condenadas total ou parcialmente. A tabela 1 exemplifica detalhadamente as causas de condenação patológica e não patológica das carcaças totais desviadas no período estudado. Para análise histológica foram coletados linfonodos de 55 carcaças (10 % do total de carcaças condenadas). Todas as carcaças avaliadas histopatologicamente tinham sido desviadas por motivos patológicos.

Tabela 1. Quantidade de carcaças desviadas ao departamento de inspeção final por causas patológicas ou não patológicas e seu destino final no período de março a setembro de 2012.

Quantidade de carcaças e destinação				
	Liberada	Embutidos Cozidos	Condenada	Total
<i>Causas não patológicas</i>				
Escaldagem excessiva	23	7	1	31
Contaminação	81	-	7	88
Criptorquida	100	-	-	100
Contusão	5	-	-	5
<i>Causas patológicas</i>				
Pneumonia enzoótica	9	11	28	48
Pleuropneumonia suína	90	36	118	244
Linfadenite	2	8	51	61
Abscessos	40	11	25	76
Inflamação ¹	26	20	53	99
Total	376	93	283	752*

*Algumas carcaças apresentam mais de um diagnóstico macroscópico;

¹Inflamações: Serosites, Aderências, Fibroses e outras;

Os achados histopatológicos em linfonodos constam na Tabela 2. A linfadenite supurativa foi detectada com maior frequência em linfonodos processados em micro-ondas que nos processados de modo convencional (Odds ratio = 3,1468). Entretanto, no processamento em micro-ondas foi observada menor frequência de detecção de depleção linfóide (Odds ratio = 0,464).

Tabela 2. Diagnóstico microscópico dos linfonodos submetidos aos processamentos rápido e convencional no período de março e setembro de 2012.

Tipo de Processamento	Diagnóstico de Linfo nodo	Variáveis Associadas		Valor de P	Odds Ratio	IC 95%
		Categoria de Respostas				
		Sim	Não			
	Depleção Linfóide					
Processamento Convencional		189	100	p < 0,01	1	0,332-0,648
Processamento Rápido		135	154			
	Linfadenite Supurativa					
Processamento Convencional		11	278	p < 0,01	1	1,5537-6,3733
Processamento Rápido		32	257			
	Hiperplasia Linfóide					
Processamento Convencional		83	206	p = 0,2796	1	0,8532-1,7313
Processamento Rápido		95	194			
	Normal					
Processamento Convencional		1	288	p = 0,1007	1	0,5887-43,6736
Processamento Rápido		5	284			
	Inconclusivo					
Processamento Convencional		5	284	p < 0,01	1	1,7472-12,5366
Processamento Rápido		22	267			

A imuno-histoquímica para circovirose dos linfonodos com depleção linfóide foi positiva em 31 casos, em 24 desses os antígenos virais foram detectados apenas nos cortes de tecidos processados de modo convencional (figura 1 e 2). Assim, o processamento rápido apresentou 0,15 menos chance de ser positivos na imuno-histoquímica.

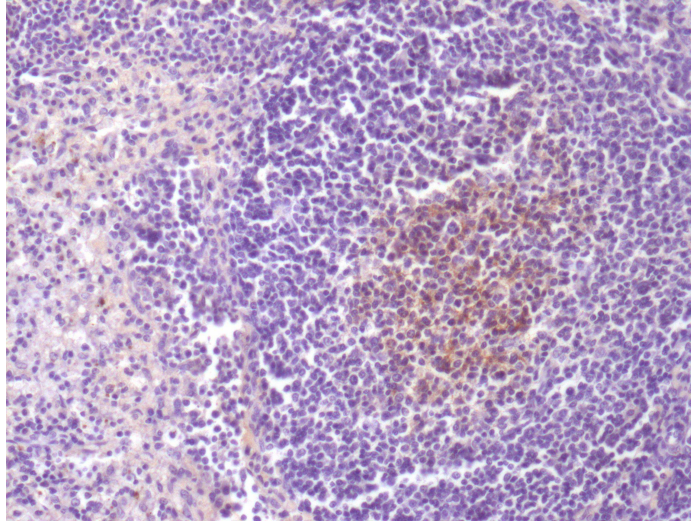


Figura 1. Linfonodo inguinal, suíno, processamento convencional. Marcação imuno-histoquímica para circovirose em células no centro de um folículo linfoide. Obj.20.

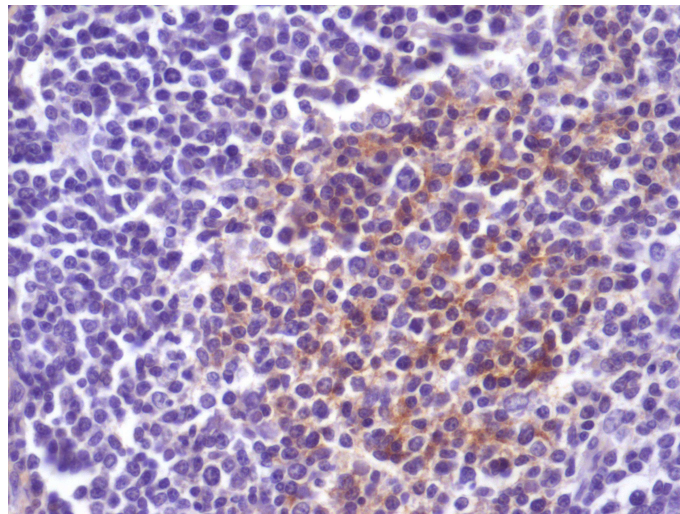


Figura 2. Linfonodo inguinal, suíno, processamento convencional. Marcação imuno-histoquímica para circovirose em células no centro de um folículo linfoide. Obj.40.

Das 458 lâminas avaliadas 95,4% (437) permitiram leitura e 4,6% (21) não permitiram leitura, dentro das lâminas que permitiram leitura observamos que apenas 23,33% dessas permitiam leituras parciais.

Em 95,4% dos cortes histológicos obtidos por meio do micro-ondas havia boa arquitetura tecidual e morfologia celular e nuclear que permitiram a observação de possíveis alterações histológicas. Não houve diferença significativa entre processamento rápido e o convencional no que se refere à morfologia nuclear como pode ser observado nas figuras 3 e 4. Quando avaliada a morfologia celular também não houve diferença estatística significativa entre os processamentos ao nível de significância de $p < 0,05$.

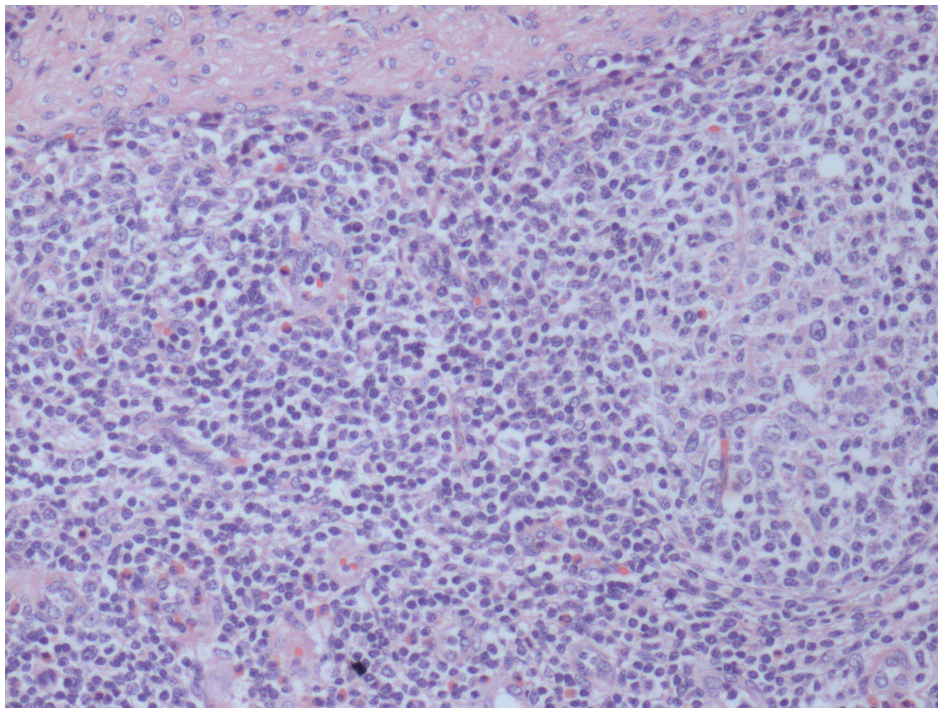
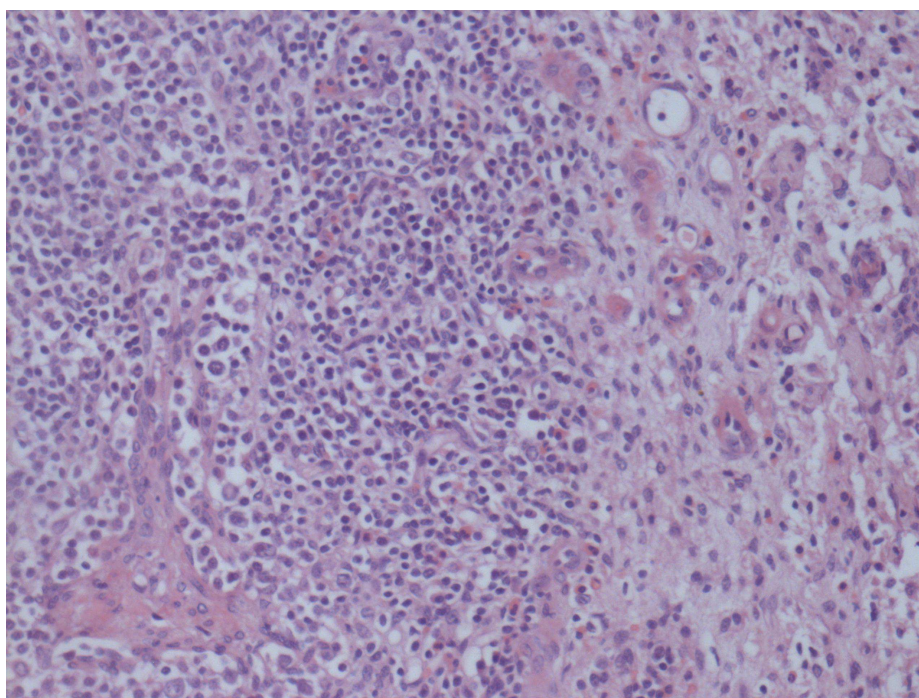


Figura 3. Linfonodo inguinal, suíno, processamento no micro-ondas. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.

A avaliação da qualidade da coloração foi avaliada em fraca, satisfatória e boa conforme pode ser observada na tabela 3. O processamento convencional apresentou um número significativamente maior de lâminas com colorações avaliadas como boa em relação ao processamento em micro-ondas.

Figura 4. Linfonodo inguinal, suíno, processamento histopatológico



convencional. Hematoxilina e eosina. Obj. 20.

Tabela 3. Avaliação da coloração da qualidade das lâminas de linfonodos submetidas ao processamento em micro-ondas e convencional no período de março a setembro de 2012.

Características de Coloração	Processamento		Total	Valor de p	Odds Ratio	IC 95%
	Micro-ondas	Convencional				
Fraca	29	8	37	-	1	-
Satisfatória	27	19	46	p= 0,057	-	-
Boa	28	57	85	p<0,01	7,4	2,3-18,2
Total	84	84	168			

DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo demonstram que não houve diferenças substanciais nos diagnósticos obtidos em cortes histológicos confeccionados pelo processamento em micro-ondas e no processamento convencional. Estes resultados estão em conformidade com os dados encontrados na literatura médica (ROHR et al., 2001; MORALES et al., 2004; STEPHEN & VERNON, 2005; EMERSON et al., 2006). Os resultados apresentados demonstram a viabilidade da aplicação do processamento dos tecidos em micro-ondas em vísceras de suínos de abatedouros para a obtenção de um diagnóstico histopatológico em um tempo consideravelmente mais curto. Com uma redução de cerca de 16 horas no processamento convencional (PROPHET et al., 1995) para cerca de 4 horas no processamento em micro-ondas empregado no presente trabalho e em trabalhos prévios (BOON et al., 1986; SURI et al., 2006). Esta redução no tempo de processamento pode permitir uma destinação mais segura de carcaças, onde houver condições para retenção das mesmas e em casos de dúvidas no diagnóstico macroscópico. Isto pode, por exemplo, permitir um melhor aproveitamento reduzindo prejuízos ao frigorífico e à indústria suinícola com condenações indevidas.

Os dados com relação a arquitetura tecidual e morfologia corroboram os resultados de estudos semelhantes em tecidos humanos (ROHR et al., 2001; MORALES et al., 2004; STEPHEN & VERNON, 2005; EMERSON et al., 2006) que demonstram a aplicabilidade da técnica. Já a afinidade dos tecidos aos corantes hematoxilina e eosina apresentou diferenças significativas entre os dois processamentos, em discordância com o observado em outros estudos (MUNKHOM et al., 2008; KANGO, DESHMUKH, 2011; ROHR et al., 2011). O processamento convencional apresentou um número significativamente maior de lâminas com colorações avaliadas como boa em relação ao processamento em micro-ondas.

Uma outra vantagem do protocolo de processamento em micro-ondas aplicado no presente trabalho é a redução de utilização de substâncias tóxicas no processamento, tal como o xilol e ainda reduz a quantidade de formol utilizada na fixação das amostras (ROHR et al., 2001).

Na literatura há vários trabalhos que relatam que o processamento rápido em micro-ondas não interfere nos resultados da imuno-histoquímica (HAFAJEE; LEONG, 2004; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006), porém, ao menos para o antígeno viral testado e com o protocolo empregado, pode haver comprometimento dos resultados da imuno-histoquímica.

Em 4,6% dos cortes histológicos obtidos pelo processamento em micro-ondas a arquitetura tecidual foi prejudicada a ponto de inviabilizar a histopatologia. O aquecimento excessivo do tecido, particularmente se não completamente fixado, pode acarretar neste comprometimento da arquitetura, fixação prévia em um tempo inadequado poderá levar a autólise do material ou até o seu cozimento (KOK & BOON, 2003). Complicações semelhantes têm sido descritas em trabalhos que empregaram aparelhos de micro-ondas domésticos para processamento histopatológico (BOON et al., 1986; SURI et al., 2006). Estudos que empregaram aparelhos de micro-ondas laboratoriais com controle de temperatura não relatam estas complicações (ROHR et al., 2001; MORALES et al., 2004; STEPHEN & VERNON, 2005; EMERSON et al., 2006). Embora sejam consideravelmente mais onerosos, estes são mais apropriados ao processamento histopatológico (KOK & BOON, 2003) e devem ser preferidos se há recursos disponíveis para a aquisição.

O processamento neste caso realizado no micro-ondas doméstico é afetado pelas características físicas do micro-ondas, ou seja, ele possui uma distribuição desuniforme de energia ou densidade de radiação devido a fenômenos de reflexão, interfase e ressonância no seu interior. O formato do recipiente utilizado durante as etapas também influencia o processamento, a

utilização de um recipiente cilíndrico age como uma lente de gera pontos focais de aquecimento. O micro-ondas convencional possui áreas quentes e frias que são constantemente alteradas dependendo das características do material a ser processado, do solvente e do recipiente utilizado. É necessário considerar sempre que a profundidade de penetração de uma onda de energia irá depender das propriedades dielétricas da amostra e material utilizado. Assim em algumas situações podem ser necessárias adaptações e padronização de protocolos para garantir um melhor resultado para determinadas amostras (CLARK et al., 2000; ROHR et al., 2001; KANGO & DESHMUKH, 2011; NAIK et al., 2012).

CONCLUSÃO

O processamento rápido de tecidos em micro-ondas possui viabilidade, permitindo um diagnóstico histopatológico rápido, podendo ser utilizado como auxílio à identificação macroscópica de lesões em carcaças desviadas para o departamento de inspeção final para que estas tenham um destino final mais adequado.

REFERÊNCIAS

BALIAN, A. C. et al. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n° 4, p. 391-97, 1997.

BOON, M. E.; KOK, L. P.; OUWERKERK-NOORDAM, E. Microwave-stimulated diffusion for fast processing of tissue: reduced dehydrating, clearing, and impregnating times. **Histopathology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 303-09, Mar. 1986.

CLARK, D. E.; FOLZ, D. C.; WEST, J. K. Processing materials with microwave energy. **Materials Science and Engineering A287**, p. 153-58, 2000.

CORRÊA, A. M. R. et al. Aspectos clínicos-patológicos à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n°1, p. 9-13, 2006.

EMERSON, L. L. et al. A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 125, p. 176-83, 2006.

HAFAJEE, Z.A.M.; LEONG, A.S-Y. Ultra-rapid microwave-stimulated tissue processing with a modified protocol incorporating microwave fixation. **Pathology**, v. 36, n. 4, p. 325-29, ago. 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. 2013. Consultado no dia 24 de junho de 2013 às 21:30.

KAHVECI, Z.; ÇAVUSOGLU, I.; SIRMALI, S.A. Microwave Fixation of Whole Fetal Specimens. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 72, n. 3, p. 144-47, 1997.

KANGO, P. G.; DESHMUKH, R. S. Microwave processing: A boon for oral pathologists. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, n°. 1, jan-apr, 2011.

KOMIJIN, R. E. et al. Granulomatous lesions in lymph node of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* sudsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 352-57, 2007.

KOK, L.P.; BOON, M.E. **Microwave for the Art of Microscopy**. Leiden: Coulomb Press Leyden, 2003. cap. 12, p. 151-163.

LARA, G. H. B. et al. Linfadenite infecciosa em suínos: Etiologia, Epidemiologia e Aspectos em Saúde Pública. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 76, n. 2, p. 317-25, abr./jun. 2009.

MAYERS, C. P. Histological fixation by microwave heating. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 23, n. 3, p. 273-75, Apr. 1970.

MORALES, A.R. et al. Continuous-Specimen-Flow, High-Throughput, 1-Hour Tissue Processing. A System for Rapid Diagnostic Tissue Preparation. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 126, p. 583-90, mai. 2002.

MORALES, A. R. et al. Experience with a automated microwave-assisted rapid tissue processing method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, p. 528-36, 2004.

MORÉS, N. et al. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 13-17, jan. 2007.

MUNKHOLM, J.; TALMAN, M.; HASSELAGER, T. Implementation of a new rapid tissue processing method – advantages and challenges. **Pathology-Research and Practice**, v. 204, p. 899-904, 2008.

NAIK, S. K. et al. Comparison of clarity of nucleocytoplasmic differentiation of oral tissues processed by microwave and conventional methods. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, p. 128-133, 2012.

PROPHET, E.B. et al. **AFIP Laboratory Methods in Histotechnology**. 1995. 280 p.

ROHR, R. L. et al. Quality of histologic sections and advantages of microwave processing. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, p. 703-708, 2001.

SANCHEZ-VASQUEZ, M. J. et al. The British pig health schemes: integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring. **Veterinary Record**. DOI: 10.1136/vr.d4814. 2011.

SORDEN, S.D. et al. Development of polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n° 6, p. 528-30, 1999.

VERNON, S. E. Continuous throughput rapid tissue processing revolutionizes histopathology workflow. **Labscience**, v. 36, n° 5, p. 300-302, 2005.

SURI, V. et al. Application of domestic microwave for urgent histopathology reporting: an evaluation. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**. v. 49, n. 3, p. 348-51, jul. 2006.