

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* POR REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE EM TRÊS DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO
DE AMOSTRAS**

PAULA RODRIGUES DE ALMEIDA

**Porto Alegre
Junho/2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR

**Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* por Reação em Cadeia da Polimerase
em três diferentes métodos de conservação de amostras**

Aluna: Paula Rodrigues de Almeida

**Trabalho de Conclusão de Curso
de Graduação apresentado à
Faculdade de Veterinária da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito
parcial para obtenção do grau de
Médico Veterinário.**

Orientador: David Driemeier

Co-orientador: Mary Jane

Tweedie de Mattos Gomes

Porto Alegre
2011/1

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae é um importante patógeno que causa pneumonia, perda de peso e condenação de carcaças no abatedouro. O diagnóstico de infecção por *M. hyopneumoniae* é frequentemente feito através de histopatologia, imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR), ou uma combinação dessas técnicas. Para exame histológico, amostras são conservadas em solução de formalina a 10%. PCR pode ser realizada a partir de amostras submetidas a vários métodos de conservação, incluindo suabes, tecido refrigerado ou congelado, ou ainda tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFEP). Entretanto, o processo de fixação em formalina pode inibir a amplificação de DNA. Para avaliar os diferentes métodos de conservação para a detecção de *M. hyopneumoniae*, 15 pulmões com lesões de consolidação crânio-ventral de suínos oriundos de rebanhos com problemas respiratórios foram selecionados no abatedouro. Suabes bronquiais e pulmão fresco foram colhidos, e um fragmento da mesma porção de pulmão foi colocado por 48 horas em solução de formalina tamponada. *Nested* PCR e PCR em Tempo Real foram realizados comparando amostras de tecido FFEP e amostras refrigeradas (suabe bronquial e tecido). O exame histopatológico dos pulmões revelou características de infecção por *M. hyopneumoniae* em 12 casos. Detecção de *M. hyopneumoniae* por *nested* PCR ocorreu em todas as amostras de suabe e tecido não fixado. Já em amostras FFEP, o agente foi detectado somente em 11 amostras. Os resultados de PCR em Tempo Real foram todos positivos para amostras de suabe e de tecido não fixado, enquanto todas as amostras FFEP foram positivas para o agente. Ao relacionar os resultados com achados histológicos, 8 de 9 animais com score de lesão 3 apresentaram resultado do *nested* PCR positivo. Resultados de PCR em Tempo Real com valor de *Cycle threshold* (Ct) entre 24,1 e 33,3 tiveram características mais compatíveis com infecção por *M. hyopneumoniae*. PCR em Tempo Real foi a técnica que melhor detectou material genético de *M. hyopneumoniae* a partir de amostras FFEP. Esta comparação demonstrou que é possível detectar *M. hyopneumoniae* a partir de amostras FFEP, porém a eficácia do teste fica comprometida sob essas condições. O estudo demonstrou que é possível detectar *M. hyopneumoniae* a partir de diferentes métodos de conservação, porém com variável eficácia.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, tecido FFEP, suíno

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is an important pathogen that causes pneumonia, weight losses and carcass condemnation in swine. The diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection is often performed through histopathology, immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction (PCR), or a combination of these techniques. For histological examination, samples are conserved in a 10% formalin solution. PCR can be performed from samples under several methods of conservation, including swabs, frozen tissue or formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissue. However, the formalin fixation process often inhibits DNA amplification. In order to evaluate whether *M. hyopneumoniae* DNA could be recovered from FFPE tissues, 15 lungs with cranioventral consolidation lesions from swine bred in herds with respiratory disease were selected in a slaughterhouse. Bronchial swabs and fresh lung tissue were collected, and a fragment of same lung portion was placed for 24h in neutral buffered formalin. Two different PCR assays were performed comparing samples of FFPE tissue with samples that were only refrigerated (bronchial swabs and tissue). Histopathological examination of the lungs revealed *M. hyopneumoniae* features in 12 cases. Nested PCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* occurred in all 15 samples of swab and refrigerated tissue, while in FFPE tissue samples, *M. hyopneumoniae* was detected in only 11 of the 15 samples. Real time PCR results were all positive for swab and untreated tissue samples and FFPE samples. The results were related to histological findings, and 8 of the 9 lungs with score 3 lesions were nested PCR positive. Real-time PCR results from FFPE samples showed more consistent histological features of *M. hyopneumoniae* infection when the Ct value was between 24.1 and 33.3. Real-time PCR test was relatively the most sensitive technique. Comparison of different sample conservation methods indicates that it is possible to detect *M. hyopneumoniae* from FFPE tissue, but the efficiency of the PCR gets compromised under these conditions.

Index Terms: *Mycoplasma hyopneumoniae*, FFPE tissue, swine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação de DNA total nas amostras submetidas a diferentes métodos de conservação.	11
Tabela 2 – Resultados da <i>nested</i> PCR nas amostras submetidas a diferentes métodos de conservação.	11
Tabela 3 – Resultados da PCR em tempo real das amostras submetidas a diferentes métodos de conservação.	12

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: HIPERPLASIA DE BALZ, CARACTERÍSTICA TÍPOCA DE INFECÇÃO POR M. HYOPNEUMONIAE.....	11
FIGURA 2: EDEMA ALVEOLAR E AUMENTADO NÚMERO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES, ACHADOS	12
FIGURA 3: RESULTADOS DE PCR EM TEMPO REAL COMPARADOS COM ESCORE HISTOPATOLÓGICO.	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3. RESULTADOS	10
4. DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÕES	16
6. REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é o principal agente causador de pneumonias em suínos, ele gera danos econômicos importantes relacionados à sanidade na indústria suína (Desrosiers 2001, Sibila et al. 2009). A infecção por *M. hyopneumoniae* resulta em alta morbidade e baixa mortalidade, a adesão do agente nos cílios do epitélio das vias aéreas inferiores afeta o sistema de defesa mucociliar, e ajuda na entrada de agentes secundários, resultando em atraso no crescimento e condenação de carcaça no abatedouro (Desrosiers 2001, Srinivasan et al. 2002, Martínez et al. 2007, Hansen et al. 2010).

A principal lesão macroscópica causada por *M. hyopneumoniae* no pulmão é a consolidação das suas porções crânio-ventrais (Sarradel et al. 2003, Ribeiro et al. 2004, Redondo et al. 2009). Microscopicamente, a hiperplasia de tecido linfoide associado a brônquios e bronquíolos (BALT) é o achado mais característico de infecção por esse agente (Sarradel et al. 2003, Redondo et al. 2009).

Cultivo e isolamento de *Mycoplasma hyopneumoniae* é reconhecido como o padrão ouro para seu diagnóstico, porém, este é menos utilizado, visto que o agente apresenta crescimento fastidioso e seu cultivo é laborioso, requerendo meio especial de Friis (Thacker 2004, Otagiri et al. 2005). Além disso, outros microorganismos podem crescer antes de *M. hyopneumoniae*, atrapalhando seu crescimento (Thacker 2004). Desta forma, o isolamento do agente fica dificultado, especialmente a partir de amostras de campo. Há outras alternativas para diagnóstico de infecção por *M. hyopneumoniae* como análise histológica, imuno-histoquímica (IHQ) ou reação em cadeia da polimerase (PCR), atualmente, essas são as técnicas mais utilizadas para diagnóstico de pneumonia por *M. hyopneumoniae* (Ribeiro et al. 2004, Thacker 2004, Otagiri et al. 2005).

Amostras encaminhadas para diagnóstico através de técnicas histológicas são mantidas em solução de formalina a 10% por um período de 24 a 48 horas e posteriormente processadas e embebidas em parafina. (Srinivasan et al. 2002, Coura et al. 2005, Delfour et al. 2006, Ferrer et al. 2007). Laboratórios de patologia possuem grandes acervos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP), o que permite estudos retrospectivos utilizando análise histológica (Ferrer et al. 2007). Para técnicas de diagnóstico utilizando biologia molecular, como PCR, DNA pode ser extraído a partir de suabes, tecido refrigerado, congelado, ou ainda de amostras FFEP.

Entretanto, formaldeído leva à formação de ligações cruzadas entre ácidos nucleicos e proteínas e causa fragmentação desses, prejudicando a extração de material genético viável para testes moleculares (Gilbert et al. 2007).

Nested PCR é uma técnica mais sensível e específica do que PCR convencional, porém ela requer reações duplicadas e há maior risco de contaminação nos resultados (Otagiri et al 2005, Marois et al. 2009). A técnica de PCR em tempo real tem as vantagens de alta sensibilidade, além de não haver necessidade de manipulação de amostras após a amplificação (Valasek and Repa 2005).

O propósito deste trabalho é avaliar detecção de *M. hyopneumoniae* através de duas técnicas de PCR diferentes, comparando amostras de tecido congelado e suabe bronquial refrigerado com amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina, e finalmente relacionar esses resultados com avaliação histológica, para avaliar cronicidade e severidade das lesões causadas por *M. hyopneumoniae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Fragmentos de quinze pulmões suínos oriundos de rebanhos com doença respiratória, apresentando consolidação crânio-ventral foram coletados em um abatedouro. O material coletado foi dividido em duas partes iguais: a primeira foi fixada em solução de formalina a 10% e embebida em parafina após um período de 24 horas; da segunda parte, coletou-se suabes bronquiais, que foram refrigerados, e a fração de pulmão foi congelada a -20°C.

Subsequentemente, processou-se rotineiramente as amostras pulmonares FFEP, corando seções de 4 µm com hematoxilina e eosina para análise histológica (Prophet et al. 1992). A análise histológica de todas as amostras foi realizada pelo mesmo patologista. Dividiu-se as lesões histológicas observadas em 3 graus, dependendo de sua relação com infecção por *M. hyopneumoniae*. A classificação foi baseada em estudos prévios, com grau 1 quando não havia lesões ou quando eram muito discretas e inespecíficas, grau 2 para lesões moderadamente indicativas, como hiperplasia de BALT sem outros achados e grau 3 para lesões muito indicativas, quando havia edema e macrófagos alveolares combinados com hiperplasia de BALT (Morris et al. 1995, Calsamiglia et al. 2001).

Extraíu-se o DNA de todas as amostras (suabe, tecido congelado e amostras FFEP). Para tanto, utilizou-se kits comerciais (Qiagen™) específicos para amostras de suabe e tecido (QiAMP DNA mini kit), e para tecido FFEP (QiAMP FFPE tissue kit). O DNA total extraído foi quantificado por espectrofotômetro.

Dois pares de oligonucleotídeos para a região do 16S ribossomal de *M. hyopneumoniae* foram utilizados nas reações de *nested* PCR. Os primers utilizados para amplificação por *nested* PCR foram os seguintes: MH_Nested_R1_Up (5'-GAGCCTTCA AGCTTCACCAAGA-3'), MH_Nested_R1_Do (5'-TGTGTTAGTGACTTTTGCCA CC-3'), MH_Nested_R2_Up (5'-ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT-3') e MH_Nested_R2_Do (5'-GTGGACTACCAGGGTATCT-3') (Yamaguti et al. 2008). O par de primers utilizados na primeira reação amplificam um fragmento de 649 pares de base (pb) e o par utilizado na segunda reação amplifica um produto de 352 pb. O volume final da reação foi de 25 µL, contendo 15 pmol/µL de cada primer, 0,5 µl de dNTP (200 µM), 0,5 µL de

MgCl₂ (1 mM), solução tampão 1x e 1U de *Taq* polimerase (Invitrogen). Utilizou-se uma amostra de cultivo de *M. hyopneumoniae* para controle positivo. Na primeira reação utilizou-se 1 µL de amostra. Para a segunda reação aplicou-se 0.5 µL de produto de PCR da primeira reação. O protocolo utilizado para os ciclos da primeira PCR da nested foi de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, finalizando com 72°C por 5 minutos. A segunda PCR prosseguiu com 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e 72°C por 5 minutos.

O par de primers e a sonda que foram utilizadas na PCR em tempo real (primers MHP50S-F, MHP50S-R e sonda Probe50S-FAM, respectivamente) ligam-se à região 50S ribossomal do genoma de *M. hyopneumoniae*. Para o desenvolvimento desses reagentes utilizou-se o software *Primer Express* 3.0 (Applied Biosystems). O sistema aplicado na reação incluiu sonda TaqMan® MGB e corante FAM como *reporter*. A reação de PCR em tempo real foi submetida ao seguinte protocolo de amplificação: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 69°C por 1 minuto, com 15 pmol de cada primer, 1mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 200 nM da sonda e 1U de *Taq* polimerase Platinum (Invitrogen). A reação foi analisada através de um equipamento StepOnePlus 7500 (Applied Biosystems). O valor de *Ct* (*Cycle threshold*) foi utilizado para estimar a quantificação de DNA-alvo para cada amostra e para comparar com lesões histológicas.

3. RESULTADOS

Características de infecção por *M. hyopneumoniae* foram observadas em 12 dos 15 casos. Hiperplasia de BALT foi constatada em 11 pulmões (Figura 1), 7 pulmões apresentaram edema alveolar e 7 tinham aumentado número de macrófagos alveolares (Figura 2). Os pulmões foram classificados de acordo com as lesões observadas, 10 pulmões apresentaram grau 3, houveram 3 pulmões classificados em grau 1 e no grau 2 haviam 2 pulmões.

Foi possível extrair mais DNA total de tecido congelado e suabe refrigerado do que de amostras FFEP (Tabela 1). A mediana encontrada nas amostras de suabe foi de 88 ng/ μ L, e nas amostras de tecido congelado foi de 148ng/ μ L, enquanto as amostras FFEP apresentaram mediana de 22 ng/ μ L.

Tabela 1 – Quantificação de DNA total nas amostras submetidas a diferentes métodos de conservação

Conservação de amostra	Quantificação de DNA total (ng/ μ L)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
Suabe refrigerado	88	32	243
Tecido congelado	148	35	406
FFEP	22	3	88

Através de *nested* PCR detectou-se *M. hyopneumoniae* em todas as amostras de suabe e de tecido refrigerado. Somente 11 amostras FFEP foram positivas na *nested* PCR (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da *nested* PCR nas amostras submetidas a diferentes métodos de conservação

Resultado da <i>nested</i> PCR	Métodos de Conservação de Amostras		
	Suabe Refrigerado	Tecido Congelado	Amostra FFEP
Positivos	15	15	11
Negativos	0	0	4

O limite de amplificação para a PCR em tempo real foi de 6 fentogramas (*fg*) de DNA puro do agente. Os resultados foram positivos em todas as amostras submetidas a diferentes métodos de conservação. Os valores de Ct de amostras de suabe apresentaram

mediana de 25,1, a de amostras de tecido congelado foi de 27,5, enquanto a mediana de amostras FFEP foi de 30,1 (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da PCR em tempo real das amostras submetidas a diferentes métodos de conservação

Conservação de amostra	Valores de Ct		
	Mediana	Mínimo	Máximo
Suabe refrigerado	25,10	15,10	32,70
Tecido congelado	27,50	22,30	36,10
FFEP	30,10	24,10	34,70

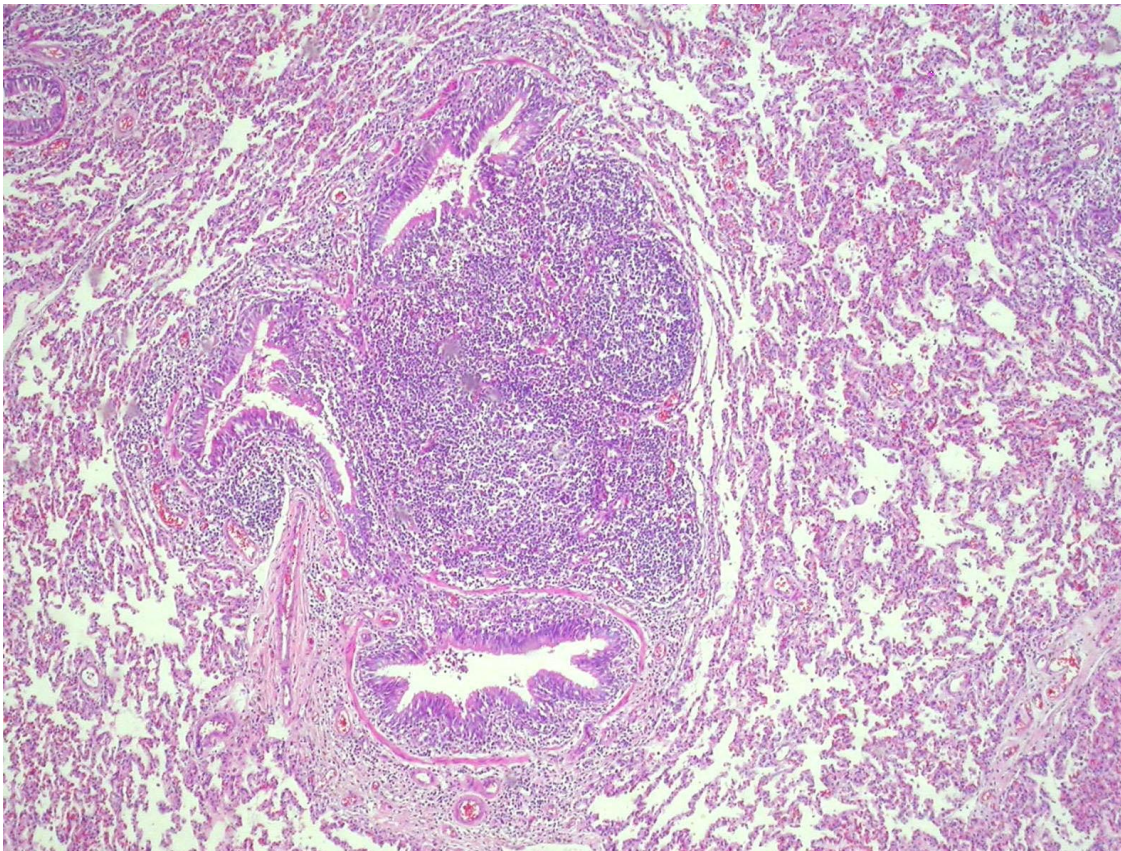


Figura 1: Hiperplasia de BALT, característica típica de infecção por *M. hyopneumoniae*. HE. Obj. 4X

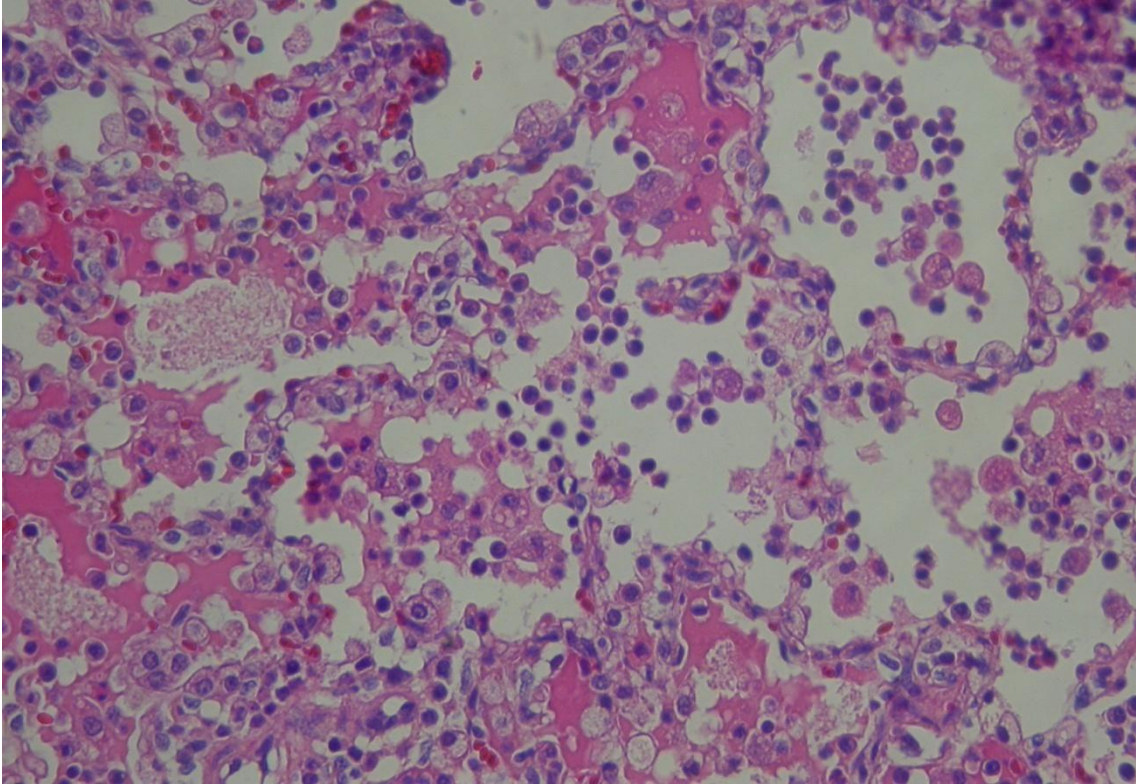


Figura 2: Edema alveolar e aumentado número de macrófagos alveolares, achados indicativos de infecção por *M. hyopneumoniae*. HE. Obj. 20X

4. DISCUSSÃO

Microscopicamente, a hiperplasia de BALT foi a lesão mais observada. Dentre os achados histológicos em pulmões de suínos, esse é altamente indicativo de infecção por *M. hyopneumoniae*. Os macrófagos alveolares e o edema alveolar podem estar associados com o agente (Redondo et al. 2009). A alta frequência de hiperplasia de BALT encontrada nos casos é esperada, pois uma das causas do achado macroscópico que foi critério de seleção das amostras (consolidação crânio-ventral) é a hiperplasia de BALT (Sibila 2007, Redondo 2009). Macrófagos alveolares e edema alveolar são alterações histológicas manifestadas inicialmente em um pulmão infectado pelo agente (Redondo 2009), lesões de grau 3 foram observadas em 10 das amostras analisadas, demonstrando que a infecção estava em estágios intermediários nesses pulmões. Apesar das duas lesões estarem relacionadas, é possível que não apareçam com igual intensidade ao mesmo tempo, por regredirem em tempos diferentes (Sibila 2007).

A quantificação de DNA total realizada após a extração de DNA mostrou que menos DNA pode ser extraído de amostras FFEP, quando comparado a suaves e tecido. A mediana apresentada em amostras de tecido foi a mais alta (Tabela 1), isso ocorre porque há mais DNA suíno nesse tipo de amostra, o que aumenta a concentração de DNA total. Parâmetros de fixação como período de permanência na solução fixativa, pH desta solução e qual o tipo de solução utilizada afetam diretamente a integridade e preservação dos ácidos nucleicos da amostra (Ferrer et al. 2007), a formalina provoca a formação de ligações cruzadas, que alteram a estrutura e fragmentam os ácidos nucleicos, prejudicando sua integridade (Delfour 2006). Neste estudo foi utilizada formalina a 10% não tamponada, pois rotineiramente recebe-se amostras fixadas nesta solução, as amostras foram mantidas nela por 24 horas, tempo mínimo necessário para fixação. Mesmo assim as concentrações de DNA total extraído dessas amostras foram inferiores às das submetidas aos outros métodos de conservação. Desta forma, a *nested* PCR e a PCR em tempo real ficam com sua capacidade de detecção comprometida quando aplicadas a amostras conservadas na forma de tecido FFEP.

Todos esses fatores explicam o fato de que todas as amostras de suave e de tecido congelado foram positivas para *M. hyopneumoniae* através de *nested* PCR, enquanto em somente 11 das amostras FFPE detectou-se o agente através dessa técnica. O resultado positivo era esperado em todas as amostras, pois concorda com alterações macroscópicas observadas (Dubosson 2004, Hansen 2010).

Nested PCR é um método consolidado e comumente utilizado para diagnóstico de *M. hyopneumoniae* (Calsamiglia 1999, Calsamiglia 2000, Otagiri 2005), porém ele é somente qualitativo, enquanto a PCR em tempo real é qualitativa, permite quantificação e o protocolo utilizado neste trabalho é mais sensível que o de *nested* PCR. A região para a qual os primers e a sonda foram projetados é uma das mais conservadas do genoma bacteriano, ao contrário de outros estudos que visaram detectar, através de PCR em tempo real, regiões que codificam proteínas que são fatores de virulência, mas que podem sofrer mutações (Marois 2010), a PCR em tempo real realizada no presente trabalho utiliza a região 50S ribossomal porque o enfoque é acessar a qualidade de diagnóstico, e não avaliação de patogenicidade. Os resultados de PCR em tempo real utilizando amostras FFEP foram todos positivos, enquanto a *nested* PCR apresentou 4 resultados negativos.

Isso ocorreu porque sob essas condições, o teste de sensibilidade realizado na PCR em tempo real demonstrou que esta foi capaz de detectar 6 fentogramas (fg) de DNA alvo, por outro lado, o resultado de teste de sensibilidade da *nested* PCR apresentou um limite de detecção de 60 picogramas (pg). Esses resultados se reproduziram nas amostras FFEP.

Resultados de PCR em tempo real de amostras submetidas a diferentes métodos de conservação tiveram valores de Ct diferentes, amostras FFEP apresentaram valores mais altos, o que indica menor carga de DNA alvo presente neste tipo de amostra, as condições que prejudicam a extração de DNA são as mesmas que indiretamente prejudicam as reações de PCR, pois a amostra já parte de uma concentração menor de DNA total.

Quando comparados às lesões histológicas, os valores médios de Ct da PCR em tempo real foram mais baixos, indicando maior carga infecciosa, em lesões grau 3, quando haviam todas as principais características de infecção pulmonar por *M. hyopneumoniae*, variando entre 20,8 e 30,4 (Figura 3). No auge da infecção por *M. hyopneumoniae*, observa-se histologicamente macrófagos alveolares, edema alveolar e hiperplasia de BALT (Caswell; Williams 2006, Sibila 2007), essas evidências concordam com os resultados apresentados, pois lesões de nível 3, que eram as que apresentavam essas características, apresentaram maior carga infecciosa. Da mesma forma, lesões de grau 1 (muito discretas ou inespecíficas) e de grau 2 (somente hiperplasia de BALT) apresentaram valores de Ct variando entre 27,3 e 34,5. É

possível que esses pulmões não estivessem mais no auge da infecção por *M. hyopneumoniae*.

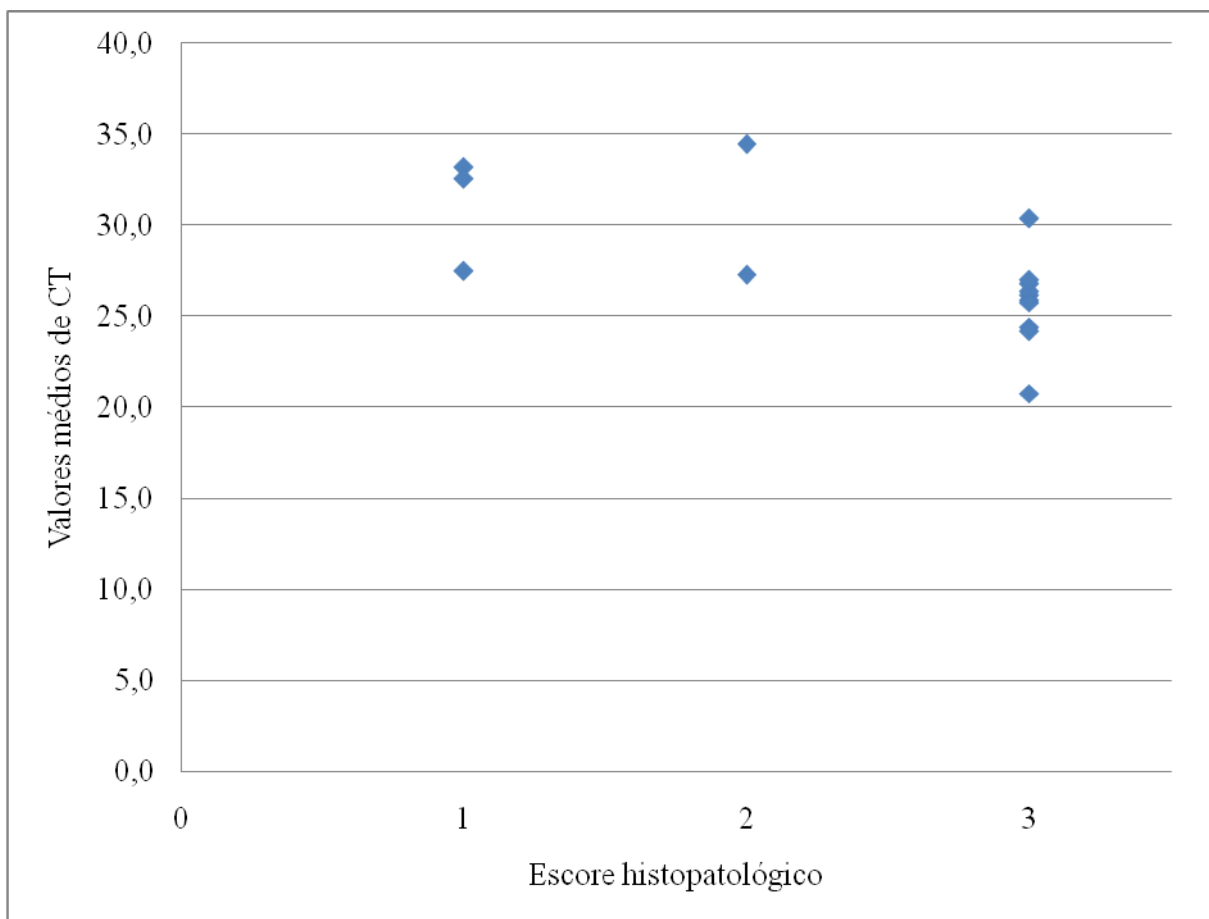


Figura 3: Resultados de PCR em tempo real comparados com escore histopatológico.

5. CONCLUSÕES

Os testes de PCR em tempo real e *nested* PCR demonstram que amostras FFEP reduzem a capacidade de detecção de *M. hyopneumoniae*. Através da quantificação de DNA total, pôde-se concluir que menos DNA é extraído dessas amostras. Embora seja possível detectar o agente em amostras FFEP, estas não devem ser assumidas como amostras ideais em um laboratório, já que há outras alternativas de conservação.

A PCR em tempo real foi mais sensível que a *nested* PCR, e forneceu mais informações sobre as amostras submetidas a diferentes métodos de conservação. Esta PCR foi capaz de detectar o agente em todas as amostras FFEP, sendo portanto mais adequada para diagnóstico do agente a partir dessas amostras.

6. REFERÊNCIAS

- BUDDLE J. R., O'HARA A. J. **Enzootic pneumonia of pigs – a diagnostic dilemma.** Australian Veterinary Journal. v.83 n.3 p.134 – 139, 2005.
- CALSAMIGLIA M., COLLINS J. E., PIJOAN C. **Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** Vet Microbiology, v. 76 p.299 – 303, 2000.
- CALSAMIGLIA M., PIJOAN C., BOSCH G. J. **Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique.** Swine Health Prod. v.7 p. 263 – 268, 1999.
- CHEIKH SAAD B. K., SHARECK F., DEA S. **Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs.** Clin. Diagn. Lab. Immunol. v. 10 n. 3 p.459-468, 2003.
- COURA R., PROLLA J. C., MEURER L., ASHTON-PROLLA P. **An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue.** J Clin Pathol v. 58 p.894–895, 2005.
- DELFOUR C., ROGER P., BRET C, BERTHE M.L., ROCHAIX P., KALFA N., RAYNAUD P., BIBEAU F., MAUDELONDE T. & BOULLE N. **RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells.** Journal of Molecular Diagnostics, v. 8 p.157 – 169, 2006.
- DESROSIERS, R. **A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections.** J Swine Health Prod, v.9 p.233 – 237, 2001.
- FERRER I., ARMSTRONG J., CAPELLARI S., PARCHI P., ARZBERGER T., BELL J., BUDKA H., STRÖBEL T., GIACCONE G., ROSSI G., BOGDANOVIC N., FAKAI P., SCHMITT A., RIEDERERS P., AL-SARRAJ S., RAVID R., KRETZSCHMAR H. **Effects of Formalin Fixation, Paraffin Embedding, and Time of Storage on DNA Preservation in Brain Tissue: A BrainNet Europe Study.** Brain Pathology, International Society of Neuropathology, p. 297 – 303, 2007.

FREY J., HALDIMANN A., KOBISCH M., NICOLET J. **Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine.** Microbial Pathogenesis, v. 17 p. 313 – 322, 1994.

GILBERT M.T., HASELKORN T., BUNCE M., SANCHEZ J.J., LUCAS S.B., JEWELL L.D., VAN MARCK E., WOROBEY M. **The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?** PLoS One. v. 2 n. 6. e537, 2007.

HANSEN M. S., PORS S.E., JENSEN H.E., BILLE-HANSEN V., BISGAARD M., FLACHS E.M. & NIELSEN O.L. **An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark.** J. Comp. Path. v.146 p. 135 – 146. 2010.

MAROIS C., DORY D., FABLET C., MADEC F., KOBISCH M. **Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs.** Journal of Applied Microbiology. v.108 p.1523-1533, 2009.

MARTÍNEZ J., JARO P. J., AUDRIZ G., GÓMEZ E. A., PERIS B., CORPA J. M. **Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter.** The Veterinary Journal. v.174 p.160–164, 2007.

MATTSON J. G., BERGSTRÖM K., WALLGREN P., JOHANSSON K. E. **Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene.** Journal of Clinical Microbiology. v. 33 p.893–897, 1995.

OTAGIRI Y., ASAI T., OKADA M., UTO T., YAZAWA S., HIRAI H., SHIBATA I., SATO S. **Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Lung and Nasal Swab Samples from Pigs by Nested PCR and Culture Methods.** J. Vet. Med. Sci. v.67 n.8 p. 801-805, 2005.

PROPHET E.B., MILLS B., ARRINGTON J.B. & SOBIN L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology.** Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p. 1992.

REDONDO E., MASOT A. J., FERNÁNDEZ A., GÁZQUEZ A. **Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*.** J Comp Path , v.140 p. 260 – 270, 2009.

RIBEIRO F. C., SILVA J.C.P., SANTOS J.L., PONTES K.C.S. **Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 56 p.709-714, 2004.

- SARRADEL J., ANDRADA M., RAMÍREZ A.S., FERNÁNDEZ A., GÓMEZ-VILLAMANDOS J.C., JOVER A., LORENZO H., HERRÁEZ P. & RODRÍGUEZ F. **A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*.** Vet. Pathol. v.40 p.395 – 404, 2003.
- SIBILA M., NOFRARÍAS M., LÓPEZ-SORIA S., SEGALÉS J., VALERO O., ESPINAL A., CALSAMIGLIA M. **Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs.** Veterinary Microbiology. v.122 p. 97-107, 2007.
- SIBILA M., PIETERS M., MOLITOR T., MAES D., HAESEBROUCK F., SEGALÉS J. **Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection.** The Veterinary Journal v. 181 p. 221–231, 2009.
- SRINIVASAN M., SEDMAK D., JEWEL S. **Effect of fixatives and tissue processing on the content integrity of nucleic acids.** American Journal of Pathology, v.161 p.1961 – 1971, 2002.
- STRAIT E. L., MADSEN M. L., MINION F. C., CHRISTOPHER-HENNINGS J., DAMMEN M., JONES K. R., THACKER E. L. **Real-Time PCR Assays To Address Genetic Diversity among Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** Journal of Clinical Microbiology, p. 2491–2498, 2008.
- THACKER E. L. **Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** Animal Health Research Reviews v.5 n.2 p.317–320, 2004.
- YAMAGUTI M., MULLER E.E., PIFFER A.I., KICH J.D., KLEIN C.S., KUCHIISHI S.S. **Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems.** Brazilian Journal of Microbiology. v.39 p. 471 – 476, 2008.