



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM
DEFESA SANITÁRIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO



ODINÉA ALVES FERRAZ SOUZA RODRIGUES

AVALIAÇÃO MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR
***Mycoplasma hyopneumoniae* EM PULMÃO DE SUÍNOS SUBMETIDOS AO ABATE**
EM SÃO LUÍS - MA

São Luís

2022

ODINÉA ALVES FERRAZ SOUZA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR
Mycoplasma hyopneumoniae EM PULMÃO DE SUÍNOS SUBMETIDOS AO ABATE
EM SÃO LUÍS - MA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

Área de Concentração: Higiene, Tecnologia e Inspeção de produtos e subprodutos de origem animal.

Orientador: Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos

São Luís

2022

Rodrigues, Odinéa Alves Ferraz Souza.

Avaliação molecular e histopatológica da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmão de suínos submetidos ao abate em São Luís – MA / Odinéa Alves Ferraz Souza Rodrigues. – São Luís, 2022.

48 f

Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro.

1.Diagnóstico molecular. 2.Pneumonia enzoótica suína. 3.Suinocultura.
I.Título.

CDU: 636.4.09:616.24-002(812.1)



Universidade Estadual do Maranhão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM DEFESA
SANITÁRIA ANIMAL

ATA N° 78

Aos dezoito dias do mês de junho do ano de dois mil e vinte e dois, às 09h00min, no na sala da aula do, instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da aluna Odinéa Alves Ferraz Souza Rodrigues. A banca examinadora foi composta pelos professoras Dr. Alcina Vieira de Carvalho Neta, UEMA, examinador externo, Nancyleni Pinto Chaves Bezerra, UEMA, examinador interna e Larissa Sarmento dos Santos UEMA, orientador. Deu-se início a abertura dos trabalhos, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, e de imediato solicitou a candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada AVALIAÇÃO MOLECULAR E HISTOPATOLÓGICA DA INFECÇÃO POR Mycoplasma hyopneumonia e EM PULMÃO DE SUÍNOS SUBMETIDOS AO ABATEEM SÃO LUÍS - MA, marcando um tempo de 30 a 45 minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Prof. Larissa Sarmento dos santos, presidente, passou a palavra ao examinador externo, Alcina Vieira de Carvalho Neta, para arguir a candidata, e, em seguida, a examinador interno, Nancyleni Pinto Chaves Bezerra, para que fizessem o mesmo; após o que fez suas considerações sobre o trabalho em julgamento; tendo sido aprovada X ou reprovada () a candidata conforme as normas vigentes na Universidade Estadual do Maranhão. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo de 60 dias; contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa. Conforme o Artigo 43 da Resolução 072/2004 - CONSUN, a candidata não terá o título se não cumprir as exigências acima.

Dr. (a) **ALCINA VIEIRA DE CARVALHO NETA, UEMA**

Examinador(a) Externo ao Programa

Dr. (a) **NANCYLENI PINTO CHAVES BEZERRA, UEMA**

Examinador(a) Interno

Dr. (a) **LARISSA SARMENTO DOS SANTOS, UEMA**

Presidente(a)

ODINEA ALVES FERRAZ SOUZA RODRIGUES

Mestrando(a)

*Dedico esta obra aos meus pais, Antônio
Gomes e Sofia Loren, que sempre me
incentivaram a prosseguir nos meus estudos,
ao meu esposo Rômulo Rodrigues e filhos
Isaac e Antônio Levi por todo incentivo e
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem sua majestosa misericórdia e amor não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Antônio Gomes e Sofia Loren, pelo amor, dedicação e carinho, fundamentais para superar os obstáculos da caminhada. Amo vocês.

Ao meu esposo Rômulo Rodrigues pelo amor expresso em cada etapa da jornada, sem sua parceria e compreensão não seria possível, amo você. Aos nossos amados filhos Isaac e Antônio Levi por deixar o caminho mais leve e feliz com toda pureza e amor que só as crianças têm.

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Larissa Sarmiento, por ter aceitado me orientar, pela atenção, apoio e por compartilhar seu conhecimento com toda humildade e paciência. Admiro a excelente profissional e ser humano que és.

A equipe de pesquisa do laboratório de micologia, em especial Elaine Dias e Nayara Silva, obrigada pela amizade e disponibilidade no desenvolvimento do experimento, vocês foram fundamentais nesta jornada.

As equipes dos laboratórios de biologia molecular e patologia veterinária pelo apoio e disponibilidade para execução das atividades laborais.

Aos proprietários dos estabelecimentos de abate animal, pela gentileza de permitir a coleta e tornar possível a elaboração desta pesquisa.

Aos docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Animal, turma sete, obrigada por toda parceria ao longo do caminho.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela oportunidade de qualificação profissional.

Obrigada a todos que me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa.

“O temor do SENHOR é o principio da sabedoria, mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino.”

Provérbios 1.7

RESUMO

O Brasil ocupa uma posição de destaque no âmbito do agronegócio mundial, sustentada pelos baixos custos de produção e pela melhoria nos índices zootécnicos. Atualmente, o país é o quarto produtor e exportador mundial de carne suína, com mais de 80% de sua produção destinada para o mercado consumidor interno. Nesse contexto, a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), que tem como principal agente causador a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae*, é relatada como a principal causa de problemas respiratórios em suínos, e sua ocorrência torna o hospedeiro susceptível a agentes secundários bacterianos e virais. Devido ao grande impacto da pneumonia na cadeia produtiva de suínos e a necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia e patogenia desta doença que contribua para a definição de medidas de controle mais eficazes, que conseqüentemente, conduzam a redução do impacto econômico gerado nos sistemas de produção de suínos. A pesquisa tem como finalidade a avaliação da infecção por *M. hyopneumoniae* na espécie suína, já descrita em outros Estados, contudo ainda não relatada no estado do Maranhão. Portanto, este trabalho, tem como objetivo pesquisar a presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos submetidos ao abate na Ilha de São Luís - MA, utilizando métodos de diagnósticos molecular e histopatológico. Para isso, foram coletadas 150 amostras de pulmão de suínos obtidos de abate fiscalizado e não fiscalizado na Ilha de São Luís, Maranhão, no período de julho de 2019 a agosto de 2021. Sendo amostragem aleatória, 65 oriundos de abate fiscalizado e 85 de abate não fiscalizado. Das 150 amostras de DNA coletadas, 121 apresentaram produto amplificado para o *Cyt B* no ensaio de PCR. Dessa forma, 121 amostras foram submetidas a análise de *M. hyopneumoniae* por qPCR, das quais, 44 apresentaram-se positivas, representando assim um percentual de 36,36%. A quantidade média de carga bacteriana variou de $1,20 \times 10^1$ a $7,20 \times 10^4$ entre as amostras, com média de $1,73 \times 10^4$ cópias. Das amostras reagentes, 81,81% (36 amostras) eram oriundas de abate não fiscalizado, comercializadas em feiras livres, enquanto que 18,18% (8 amostras) tinham origem de abatedouro com fiscalização. Na análise histopatológica, das 44 amostras positivas na qPCR, 30/44 foram apresentaram achados condizentes com processos inflamatórios, que incluíam a presença de hiperplasia de BALT, pneumócitos, edema alveolar, hemorragia, congestão e enfisema. Os achados microscópicos associados as quantificações evidenciam que existe relação entre a quantificação do agente patológico e a presença de lesão microscópica, demonstrando que a maior carga bacteriana no tecido pulmonar está associada com a maior marcação histopatológica para hiperplasia de BALT, visto que, as 3 amostras carga bacteriana mais elevada (qPCR: $5,63 \times 10^3$, $2,19 \times 10^4$ e $7,23 \times 10^4$) foram as que mais evidenciaram este achado.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, Pneumonia Enzoótica Suína, Suinocultura.

ABSTRACT

Brazil occupies a prominent position in the world agribusiness, supported by low production costs and the improvement in zootechnical indices. Currently, the country is the world's fourth largest producer and exporter of pork, with more than 80% of its production destined for the domestic consumer market. In this context, Porcine Enzootic Pneumonia (PES), whose main causative agent is the bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is reported as the main cause of respiratory problems in swine, and its occurrence makes the host susceptible to secondary bacterial and viral agents. Due to the great impact of pneumonia on the swine production chain and the need for a better understanding of the epidemiology and pathogenesis of this disease that contributes to the definition of more effective control measures, which consequently lead to the reduction of the economic impact generated in production systems of pigs. The research aims to evaluate the infection by *M. hyopneumoniae* in swine, already described in other states, but not yet reported in the state of Maranhão. Therefore, this work aims to investigate the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine submitted to slaughter in São Luís Island - MA, using molecular and histopathological diagnostic methods. For this, 150 lung samples were collected from pigs obtained from supervised and unsupervised slaughter on São Luís Island, Maranhão, from July 2019 to August 2021. Being random sampling, 65 from supervised slaughter and 85 from slaughter not supervised. Of the 150 DNA samples collected, 121 showed an amplified product for Cyt B in the PCR assay. Thus, 121 samples were submitted to analysis of *M. hyopneumoniae* by qPCR, of which 44 were positive, thus representing a percentage of 36.36%. The average amount of bacterial load ranged from 1.20×10^1 to 7.20×10^4 between samples, with an average of 1.73×10^4 copies. Of the reagent samples, 81.81% (36 samples) came from unsupervised slaughter, marketed at open markets, while 18.18% (8 samples) came from an supervised slaughterhouse. In the histopathological analysis, of the 44 positive samples in the qPCR, 30/44 had findings consistent with inflammatory processes, which included the presence of BAL hyperplasia, pneumocytes, alveolar edema, hemorrhage, congestion and emphysema. The microscopic findings associated with the quantifications show that there is a relationship between the quantification of the pathological agent and the presence of microscopic lesion, demonstrating that the greater bacterial load in the lung tissue is associated with the greater histopathological staining for BAL hyperplasia, since the 3 samples higher bacterial load (qPCR: 5.63×10^3 , 2.19×10^4 and 7.23×10^4) were the ones that most evidenced this finding.

Keywords: Molecular diagnosis, Swine Enzootic Pneumonia, Pig farming.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista de iniciadores utilizados na PCR quantitativa em tempo real.	275
Tabela 2- Quantificação média da carga bacteriana nas amostras reagentes em qPCR para <i>M. hyopneumoniae</i>	297
Tabela 3- Percentual de amostras positivos e presença de lesões histopatológicas características de infecção por <i>M. hyopneumoniae</i> , de acordo com o local de coleta.	29
Tabela 4 – Principais achados histopatológicos encontrados nas amostras reagentes em qPCR para <i>M. hyopneumoniae</i>	33
Tabela 5 - Quantificação média da carga bacteriana nas amostras reagentes em qPCR em comparação entre amostras sem e com maior marcação histopatológica para <i>M. hyopneumoniae</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de PCR para o gene endógeno CytB. M= Marcador de peso molecular; CN = Controle negativo; CP = Controle positivo; 1-2-3-4-6-7-8-9 = Amostras positivas; 5 = Amostra negativa.....27

Figura 2- Corte histológico de pulmão de suíno. A, Parênquima pulmonar sem alterações (HE, objetiva de 4x, barra 500 µm); B, Discreta hiperplasia de tecido linfoide associado ao bronquíolo (seta vermelha), observa-se também discreto espessamento alveolar com células inflamatórias, (HE, objetiva de 10x, barra 200µm); C, Difusa infiltração de células inflamatórias com perda total do parênquima pulmonar, observa-se apenas células inflamatórias, (HE, objetiva de 10x, barra 200µm); D, Hiperplasia de tecido linfoide associado ao bronquíolo severa (seta vermelha), (HE, aumento de 40x, barra 50 µm); E, Processo inflamatório polimorfonuclear, com acentuada presença de neutrófilos segmentados e macrófagos (seta amarela), com moderada quantidade de linfócitos e hemorragia, (HE, aumento de 40x, barra 50 µm); F, Difusa inflamação mononuclear, com acentuada presença de macrófagos (seta azul), congestão vascular, (HE, aumento de 40x, barra 50 µm)..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BALT	Tecido Linfóide Associado aos Brônquios
CA	Conversão alimentar
Ct	Cycle threshold
<i>Cyt B</i>	Gene Citocromo B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GPD	Ganho de peso diário
GRSC	Granjas de Reprodutores Suídeos Certificados
HE	Hematoxilina e Eosina
IF	Ensaio de imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
IHC	Imunohistoquímica
IHS	Hibridização <i>in situ</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV-2	Circovírus suíno tipo 2
PES	Pneumonia Enzoótica Suína
PNP	Pneumonia Proliferativa Necrosante
PRDC	Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos
qPCR	Reação em cadeia da polímerase quantitativa
RT-PCR	Reação em cadeia da polímerase em tempo real
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão

LISTA DE SIMBOLOS

%	Por cento
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Pneumonia Enzoótica Suína	18
3.2 Mycoplasma hyopneumoniae	19
3.2.1 Etiologia	19
3.2.2 Epidemiologia	20
3.2.3 Patogênese e Sinais Clínicos	21
3.2.4 Diagnóstico.....	22
3.2.5 Tratamento e Controle.....	23
4 OBJETIVOS	25
4.1 Geral	25
4.2 Específicos	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Animais e colheita de amostras	26
5.2 Extração de DNA	26
5.3 Reação em cadeia pela polimerase	26
5.3.1 PCR convencional para o gene endógeno Citocromo B (Cyt B)	26
5.3.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	27
5.4 Histopatologia	27
5.5 Análise Estatística	28
5.6 Comitê de Ética	28
6 RESULTADOS	29
7 DISCUSSÃO	34
8 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição de destaque no âmbito do agronegócio mundial, sustentada pelos baixos custos de produção e pela melhoria nos índices zootécnicos. De semelhante modo, a suinocultura brasileira vem ampliando a sua participação no cenário global em razão da intensificação dos sistemas de produção, que conferem ao setor maior rentabilidade e acentuação da eficácia produtiva (CIACCI-ZANELLA et al., 2009).

Atualmente, o país é o quarto produtor e exportador mundial de carne suína, ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos, com mais de 80% de sua produção destinada para o mercado consumidor interno (ABRA, 2019). Entretanto, os desafios sanitários, representados principalmente por doenças respiratórias e entéricas, atuam como entraves à otimização dos resultados zootécnicos, diminuindo a competitividade do país no mercado mundial (CIACCI-ZANELLA et al., 2009).

Na suinocultura moderna, o aparecimento de doenças respiratórias tornou-se comum, principalmente devido às condições de confinamento às quais os animais são submetidos, o que propicia o acúmulo de gases e a circulação de agentes patogênicos, acarretando em perdas econômicas ocasionadas pelo baixo rendimento dos animais, gastos com tratamentos e/ou com programas de prevenção e controle de doenças (STRAW et al., 1990; DOŠEN et al., 2007; MAES et al., 2008).

Nesse contexto, a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é relatada como a principal causa de problemas respiratórios em suínos, tendo como principal agente causador a bactéria *Mycoplasma hyopneumoniae* (STEVENSON, 1998). Sua ocorrência torna o hospedeiro susceptível a agentes secundários bacterianos ou virais, como o circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), ambos envolvidos no Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC, do inglês *Porcine Respiratory Disease Complex*), responsável por grandes prejuízos na suinocultura nacional e mundial (MAROIS et al., 2007; HE et al., 2011; HEIN, 2012).

A PES é uma doença altamente contagiosa, de distribuição cosmopolita, caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, tosse crônica e retardo do crescimento (OBOEGBULEN, 1981; TAMIOZZO et al., 2011). Sua importância se deve à alta morbidade, que está relacionada à redução da conversão alimentar e consequente diminuição do ganho de peso médio diário dos animais (CONCEIÇÃO e DELLAGOSTIN, 2006).

Estudos de soroprevalência realizados no mundo relataram a presença do agente em 83,3% (10/12) das granjas examinadas na China (HE et al., 2011), 64,8% (1671/2578) entre porcas na Alemanha (GROSSE BEILAGE et al., 2009) e em 88% das amostras colhidas de

animais procedentes de 50 granjas de terminação na Bélgica, todas com animais infectados (MAES et al., 1999). No Brasil, esta doença é encontrada em quase todas as áreas produtivas (MORENO et al., 1999; SOBESTIANSKY et al., 2001).

Devido aos prejuízos econômicos causados à suinocultura, o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* é de extrema relevância para o controle efetivo da PES, o qual é feito com base na observação de sinais clínicos compatíveis, lesões microscópicas e macroscópicas específicas (MORÉS et al., 2012; SEGALÉS, 2012), e na detecção do agente por meio de isolamento, hibridização *in situ* (IHS), imunohistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (IF) (ELLIS et al., 1999), reação em cadeia da polimerase (PCR) suas variações, como a multiplex-PCR, a nested-PCR e a RT-PCR (MADSON et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A suinocultura é um setor agropecuário de grande importância para a economia brasileira, caracterizado por elevados investimentos em genética, nutrição e manejo. Nesse cenário, o Maranhão ocupa o terceiro lugar na suinocultura do Nordeste, precedido pelos estados do Ceará e Bahia, e apresenta um rebanho de 1.070.188 cabeças, de acordo com dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

Segundo instrução normativa nº 19, de 15 de fevereiro de 2002, da defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para garantir o certificado das granjas de suídeos, as mesmas devem ser livres das seguintes doenças: peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose, sarna, bem como livre ou controlada para leptospirose. A certificação de livre para pneumonia enzoótica dos suínos, depende da solicitação do proprietário da granja junto ao MAPA (BRASIL, 2009).

Os diversos sistemas de produção enfrentam grandes perdas econômicas causadas pelas doenças respiratórias, como a PES. Estima-se que, no Brasil, a maioria das granjas comerciais sejam positivas para *M. hyopneumoniae*, considerado o patógeno respiratório mais importante para suínos no país, e a permanência deste nas criações dificulta os programas de erradicação nas granjas (TAKEUTI et al., 2017). No Brasil, 50% das carcaças condenadas durante o abate apresentam lesões pulmonares características de pneumonias (ALBERTON e MORAES, 2008). Um estudo realizado em granjas com produção comercial de suínos no estado de Pernambuco, que teve como objetivo analisar o índice para pneumonia (IPP), encontrou um IPP grave em 43,75% de 32 granjas avaliadas (VALENÇA et al., 2016).

A baixa produtividade dos animais e declínio na qualidade da carcaça é associado muitas vezes a presença de lesões pulmonares (TEIXEIRA et al., 2016, PERMENTIER et al., 2015, HARLEY et al., 2012). Pagot et al. (2007) descrevem que suínos com lesões características de pneumonia apresentam taxa de crescimento reduzida em até 7% e 20% em animais com lesões de pleurisia. O aumento dos valores em escores de pneumonia resultam em animais com menor peso vivo, alterando negativamente o padrão da carne suína e uma menor qualidade nas carcaças, por levar a alterações nos valores de pH, na capacidade de retenção de água, coloração, perda em propriedades de cocção e alteração de sabor (DAILIDAVICIENÉ et al., 2009; COBANOVIC et al., 2016; KARABASIL et al., 2017).

Devido ao grande impacto da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* na cadeia produtiva de suínos, e a necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia e patogenia desta doença que contribua para a definição de medidas de controle mais eficazes. Diante disso,

faz-se necessária a pesquisa que tem como finalidade a avaliação da infecção por *M. hyopneumoniae* na espécie suína, já descrita em outros Estados (OPRIESSNIG et al., 2004; BEZERRIL et al., 2012; MORÉS et al., 2015), contudo ainda não relatada no estado do Maranhão.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pneumonia Enzoótica Suína

A PES é uma doença infecciosa de caráter crônico, tendo como principal agente causador a bactéria, *M. hyopneumoniae*. A propagação da PES no rebanho se dá por contato direto e indireto, e sobretudo através de aerossóis expelidos durante a tosse. O perfil crônico desta enfermidade afeta o desenvolvimento dos animais acometidos, diminuindo a conversão alimentar (CA), o ganho de peso diário (GPD) e predispondo o animal a infecções secundárias (THACKER, 2006; MAES et al., 2008; REDONDO et al., 2009). A PES tem baixa mortalidade e alta morbidade, fatores estes relacionados com a baixa conversão alimentar e atraso no GPD (é comum observar assimetria de peso entre leitões da mesma idade), causam grandes prejuízos econômicos para os produtores e indústria, devido a gastos com assistência médica veterinária, medicamentos, medidas reforçadas de biossegurança e consequente depreciação das carcaças (ROSS, 1999; ALMEIDA, 2019).

Sistemas de produção contínuo, falta de higiene, temperatura, umidade, ventilação e gases, aumentam o risco de incidência da PES (SCHWARTZ, 2001; FERRACINI e PIASSA, 2021). As doenças respiratórias que acometem os suínos, geralmente são causadas por diversos agentes infecciosos (OPRIESSNIG et al., 2011). Os principais agentes secundários relacionados a PES, são: as bactérias *Actinobacillus pleuropneumoniae* e a *Pasteurella multocida* (BARCELLOS et al., 2008). Outros patógenos pertinentes a casos de pneumonias em suínos, são os vírus da Influenza Suína, PCV-2, entre outros (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2012).

A PES está presente em todos os países que possuem criação de suínos, tendo altos níveis de prevalência, no entanto poucos são os dados publicados (PIETERS et al., 2019). De acordo com Constable et al. (2020), estima-se que em criações intensivas, cerca de 40 a 80% dos pulmões de suíno apresentam lesões características nos abatedouros. A análise qualitativa e quantitativa das lesões de pulmão relacionada a PES é utilizada para calcular a prevalência de leitões acometidos. Estes dados são analisados por programas de computador que apuram as áreas de comprometimento pulmonar pela doença, estimativa de perda de GPD e melhora na CA. Sendo uma ferramenta importante para determinar aplicabilidade de protocolos vacinais ou medicamentosos (MORES, 2006).

Estudos realizados na França por Fablet et al. (2012), apresentaram prevalência de 71,8% para *M. Hyopneumoniae* em suínos em confinamento. No Brasil, estudos apontam prevalência de 56% em média e 80% em suínos ao abate (KICH E PONTES, 2001, Vicente et

al., 2013). A PES não é uma doença limitante para comercialização da carne suína, embora em 67% das carcaças condenadas por lesões pulmonares seja encontrado alterações características da infecção. É suposto que a não restrição a comercialização, corrobore para a ausência de dados na literatura sobre a prevalência específica por país (MORES, 2006; MAES et al., 2018). Aquiescente a isto, o MAPA através da Instrução Normativa Nº 19 de 15/02/2002, dita que o controle do *M. hyopneumoniae* em Granjas de Reprodutores Suídeos Certificados (GRSC) é de caráter opcional (BRASIL, 2002).

3.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

3.2.1 Etiologia

M. hyopneumoniae é o agente primário da PES, doença de caráter crônico, caracterizada por tosse seca de intensidade variada, queda no ganho de peso diário dos animais, alta morbidade e baixa mortalidade (SIBILA et al., 2009; VRANCKX et al., 2012; TAKEUTI et al., 2017). É um agente pertencente à Família Mycoplasmataceae da Classe Mollicutes e Filo Firmicutes (GOODWIN et al., 1968). Os únicos hospedeiros considerados suscetíveis ao *M. Hyopneumoniae* são suínos domésticos e javalis, sendo que as manifestações clínicas da doença ocorrem principalmente durante os períodos de crescimento e terminação (PIETERS et al., 2019).

O patógeno foi isolado pela primeira vez na década de 60, sendo citado como agente causador da PES (GOODWIN et al., 1965; MARE E SWITZER 1965). Assim como outros micoplasmas, este possui genoma pequeno, com ausência de parede celular, tornando-o bastante pleomórfico. Além da presença de vias metabólicas deficientes, genomas pequenos resultam em capacidade de codificação reduzida para reagentes (SIQUEIRA et al., 2014). É uma bactéria muito exigente nutricionalmente para crescimento in vitro. O meio de cultivo desenvolvido por Friis (1975) para *M. hyopneumoniae*, é considerado padrão. Diante das exigências nutricionais, lenta taxa de crescimento e o desenvolvimento exacerbado com outras bactérias, principalmente *M. hyorhinis*, Cook et al. (2016) aprimoraram o meio original, através da inclusão de canamicina, inibindo assim o crescimento de *M. hyorhinis*. A diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*, divergem em virulência, agravando o quadro clínico pneumônico e consequentemente número de animais infectados (VICCA et al., 2003; MEYNS et al., 2007; WOOLLEY et al., 2012).

3.2.2 Epidemiologia

O contato direto, segundo Nathues et al. (2013), é a principal forma de transmissão do *M. hyopneumoniae*, e principal fator contaminante das granjas, visto que os suínos nascem livres de doença, não havendo evidências de transmissão vertical (BATISTA et al., 2004). A bactéria subsiste no trato respiratório dos suínos por grandes períodos, inclusive após reabilitação pulmonar. De acordo com Pieters et al. (2009), o período mais longo já observado, foi de 214 dias após a infecção. Apesar do contato direto ser o meio de transmissão mais importante, Otake et al. (2010) demonstraram que a via aerógena é capaz de disseminar o patógeno por até 9,2 km e ainda permanecer viável. Levando em consideração localidades densamente povoadas, essa distância apresenta-se como um fator importante a ser considerado (DEE et al., 2009).

As gotículas expelidas através da tosse de animais infectados, pode contaminar suínos já na primeira semana de vida (SIBILA et al., 2007), ou seja, já no período de lactação, sendo este um importante fator de risco para colonização do *M. hyopneumoniae*, oriundos de fêmeas lactantes contaminadas (PIETERS et al., 2014). Anualmente cerca de 50% das marrãs são repostas nas granjas, para substituir as fêmeas descartadas (ENGBLOM et al., 2007), evidenciando que altas taxas de reposição, colaboram com aumento da doença (NATHUES et al., 2013). Um estudo realizado, Fano et al. (2006), relata que fêmeas com menor número de parição, aumentam a taxa de transmissão do *M. hyopneumoniae*, visto que as porcas jovens são mais propensas a transmitir o agente à seus filhotes. Takeuti et al. (2017) afirmam que até 15,7% das marrãs primíparas de reposição, podem apresentar PCR positiva.

No sistema de produção em múltiplos – sítios, onde ocorre a fusão dos lotes na creche, período pós desmame que é marcado pela queda na imunidade dos animais, é responsável pela severidade da doença na fase de terminação (SIBILA et al., 2007). Em um sistema de criação de fluxo contínuo, o contato direto ou exposição indireta, através de um mesmo espaço aéreo com suínos mais velhos, é possível observar uma maior prevalência da infecção, com animais positivos a partir de 8 semanas de idade (GIACOMINI et al., 2016; VRANCKX et al., 2012). Estudos demonstraram que em condições experimentais, animais negativos para *M. hyopneumoniae*, submetidos a altas doses infectantes, apresentaram tosse e lesões pulmonares 7 a 14 dias após infecção, alcançando pico de gravidade no 28º dia (BLANCHARD et al., 1992; LORENZO et al., 2006; VILLARREAL et al., 2011).

A bactéria *M. hyopneumoniae* é um resistente agente patogênico, visto que sobrevive até 48h em dessecação, até 17 dias em água de chuva com temperatura entre 2 a 7°C. Desta

forma, levando em consideração condições sazonais adequadas, é um longo período de sobrevivência, podendo ultrapassar o intervalo de vazio sanitário praticado pelas granjas (ANDRADE, 2018). *M. hyopneumoniae* está presente na maioria das granjas dos países que possuem produção intensiva, no entanto poucos são os dados publicados a respeito dos níveis de prevalência existente (MAES et al., 2008; PIETERS et al., 2019). Estudos imunohistoquímicos realizados por Morés et al. (2015), evidenciam uma prevalência de 74% de *M. hyopneumoniae* em pneumonia suína no Brasil. Em correlação a este dado, a pneumonia em suínos de abate no Brasil, apresenta uma prevalência de 75% (SILVA et al., 2001; GABARDO et al., 2013).

3.2.3 Patogênese e Sinais Clínicos

Ao adentrar no trato respiratório, o *M. hyopneumoniae* dá início a colonização a longo prazo no epitélio ciliado, principalmente nos brônquios e bronquíolos, provocando uma reação inflamatória lenta e modulação da resposta imune (ROSS, 1999; PIETERS et al., 2019). Por ser uma doença de evolução crônica (THACKER & MINION, 2012), embora a infecção ocorra nas primeiras semanas de vida do leitão, a gravidade da enfermidade é revelada nas fases de terminação e engorda, quando os prejuízos no ganho de peso evidenciam o comprometimento pulmonar (SIBILA et al., 2009).

A bactéria causa destruição ciliar, seguida de morte celular, pouco tempo depois de aderir-se ao epitélio (BLANCHARD et al., 1992; YOUNG et al., 2000), sendo as áreas pulmonares mais afetadas, os lobos apicais e cardíacos (BENDJENNAT et al., 1999; BLANCHARD et al., 1992). Em resposta aos danos epiteliais e tentativa de repô-los, é gerada uma hiperplasia celular (THACKER E MINION, 2012). Esse fenômeno causa uma redução na capacidade de limpeza mucociliar, predispondo assim infecções respiratórias bacterianas e virais secundárias (CIPRIAN et al., 1994; PARK et al., 2016). A broncopneumonia catarral, principal lesão pulmonar causada pelo *M. hyopneumoniae*, está associada microscopicamente a grande infiltração de neutrófilos, macrófagos e hiperplasia de tecido linfóide associada aos brônquios (BALT) (REDONDO et al., 2009; THACKER E MINION, 2012; HILLEN et al., 2014). As lesões macroscópicas causadas pela PES, são com maior frequência localizadas na região cranioventral do pulmão, principalmente nos lobos apicais e cardíacos. São lesões de delimitação aparente, com coloração de púrpura à cinza (THACKER et al., 2012).

As alterações macroscópicas mais observadas no abate e necropsia, ocasionadas pelo *M. hyopneumoniae*, são atelectasias pulmonares, geradas a partir do avanço da hiperplasia de

BALT, provocando broncoconstrição e assim obstruindo as vias aéreas (MAES et al., 2008; REDONDO et al., 2009; DEBLANC et al., 2013; THACKER E MINION, 2012). O desenvolvimento do quadro clínico de pneumonia, está diretamente ligado a difusa colonização do trato respiratório pelo respectivo agente patogênico. A capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro e a virulência da cepa, são fatores primordiais para determinar a severidade da infecção, porém a possibilidade de predispor o animal a infecções secundárias, agravando o quadro clínico, constitui a principal relevância econômica da bactéria *M. hyopneumoniae* (MEYNS et al., 2011; PIETERS et al., 2019).

A localização preferencial do *M. hyopneumoniae* na superfície epitelial do trato respiratório, dificulta o combate de anticorpos séricos, tipo IgG, fato este que culmina na ausência de imunidade protetora contra a doença, porém impede a propagação para demais órgãos (THACKER & MINION, 2012; PIETERS et al., 2014). De acordo com Pieters et al. (2019), o *M. hyopneumoniae* manifesta-se de duas formas clínicas, sendo elas endêmica e epidêmica. A forma epidêmica ocorre esporadicamente, quando o plantel nunca antes infectado, é então contaminado. Nesse caso, a disseminação ocorre de maneira acelerada, envolvendo todos os animais. Os sinais clínicos, de tosse, insuficiência respiratória aguda, febre, prostração e redução do apetite, estão presentes levando animais a óbito. No decorrer de 5 meses após essa primeira fase, o padrão endêmico é estabelecido no rebanho. Nesta fase, o sinal mais comum é a tosse não produtiva, com início remoto, afetando apenas alguns animais, principalmente na fase de creche, engorda e terminação (VICCA et al., 2003). A forma subclínica é a principal apresentação da doença com lenta taxa de transmissão (DESROSIERS, 2001; THACKER, 2006).

Concomitantemente ao surgimento dos sinais clínicos, por volta dos 14 dias pós infecção, ocorre o aparecimento de lesões no parênquima pulmonar, caracterizadas por áreas de consolidação, denominadas de lesões do tipo hepatização, e coloração que varia de púrpura a cinza (SOBESTIANSKY et al., 2007). Entretanto, as lesões tendem à resolução aos 85 dias pós infecção; deste modo, caso a infecção tenha ocorrido em animais muito jovens, é possível que, ao momento do abate, a maioria deles não apresente lesões pulmonares características da doença (SORENSEN et al., 1997).

3.2.4 Diagnóstico

As infecções causadas por *M. hyopneumoniae* não causam sintomatologia clínica específica, de maneira que os sinais gerados são sugestivos (PIETERS et al., 2019). A

identificação e análise quantitativa da tosse no rebanho, demonstraram ser significativos para detectar o início da patologia (NATHUES et al., 2013). A acurácia da cultura como meio de diagnóstico, torna este o padrão ouro para identificação do agente, no entanto, não é o mais utilizado, pois as exigências nutricionais da bactéria, prejudicam seu crescimento, levando a resultados falso negativo (KOBISCH E FRIIS, 1996; THACKER, 2012). A análise histológica de lesões encontradas post mortem, permite a realização de IHC e IHS, método barato e habitualmente utilizado em laboratórios veterinários (PEREIRA et al., 2017).

A PCR e suas variações, como a multiplex-PCR, a nested-PCR e a RT-PCR é um teste sensível e específico para confirmação do agente, cada vez mais empregado no diagnóstico (KOBISCH E FRIIS, 1996; MADSON et al., 2009). Outro método também disponível no mercado, é o de ELISA (ensaio imunoenzimático), possuindo alta especificidade em identificar soros negativos, apresentando baixa proporção de falso-positivos (THACKER, 2004). Estudos realizados por Petersen et al. (2016), sugerem que infecção conjunto com outros micoplasmas não patogênicos (*M. flocculare*) é a razão para os falso-positivos detectados no exame de ELISA.

Durante o abate de suínos os pulmões são avaliados macroscopicamente, com finalidade de quantificar a prevalência e intensidade das lesões sugestivas de PES. Baseado nesta análise, é feito estudo histopatológico e testes confirmatórios, para não superestimar os dados, visto que outras patologias respiratórias também geram características semelhantes (SIBILA et al., 2009; FRAILE et al., 2010; Merialdi et al., 2012). Em contrapartida, a prevalência baseada em achados macroscópicos, seguidos de análises laboratoriais, pode vir a ser mascarada, pois com o avançar da idade dos animais acometidos, as lesões pulmonares tendem a ser recuperadas. De maneira que, a falta de achados sugestivos de PES no abate, não confirma ausência de contaminação, porém ressalta a importância de exame clínico minucioso em conjunto com provas laboratoriais (Sorensen et al., 1997; Pieters et al., 2019).

3.2.5 Tratamento e Controle

O tratamento com antimicrobianos, apesar de não extinguir o agente ou curar as lesões, tem por finalidade tratamento sintomático e redução dos sinais clínicos (MAES et al., 1996). Desta forma, a aplicação dessas medicações no plantel, requer de análise diligente, devido ao risco de promover microrganismos resistentes (MAES et al., 2020). O *M. hyopneumoniae* não possui parede celular, fato este que impede a ação de antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) que agem diretamente nesta estrutura (WU et al., 1997; WALKER, 1999). A

ausência de parede celular, colabora para o controle deste patógeno no espaço físico das granjas, pois são excessivamente sensíveis ao calor, detergentes e desinfetantes (ANDRADE, 2018).

Os antibióticos eficazes contra esta bactéria, são as tetraciclinas, macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas, fluorquinolonas, anfenicóis e aminoglicosídeos. Dentre estes, os mais utilizados nas infecções respiratórias de origem bacterianas são as tetraciclinas de macrolídeos, impedem a multiplicação dos microrganismos, através de sua ação na síntese proteica (TIMMERMAN et al., 2006; PEPOVICH et al., 2015). O tratamento sistêmico, pode ser aplicado de forma contínua, pulsada ou estratégica. A forma contínua é fornecida permanentemente e a pulsada é fornecida em períodos de maior acometimento dos animais pela *M. hyopneumoniae*. Sendo assim, diante do favorecimento de resistência microbiana, estas duas formas não são recomendadas (SOBESTIANSKY et al., 2007; MAES et al., 2008). A forma estratégica é a melhor recomendada, sendo aplicada antes do período crítico de manifestação clínica, no entanto não impede a infecção dos animais (MAES et al., 2008).

O controle da PES no rebanho suíno é um desafio, visto que com uso da biossegurança, imunizantes e antibióticos, ainda assim a prevalência de patógenos como *M. hyopneumoniae*, permanece de maneira elevada no plantel. As vacinas comerciais são compostas de células inteiras, inativas e com adjuvante, com método de aplicação intramuscular (MAES et al., 2018). Apesar de atuar de forma limitada, não impedindo a colonização das vias respiratórias, a imunização é uma das principais ferramentas no controle da *M. hyopneumoniae* (THACKER et al., 1998; THACKER et al., 2000; HAESEBROUCK et al., 2004), visto que promove a diminuição dos casos graves de lesões pulmonares, garantindo progresso na conversão alimentar e ganho de peso diário (MAES et al., 1999).

A limitação das vacinas intramusculares, disponíveis no mercado, é devido a ineficiência no estímulo da imunidade nas mucosas (MURTAUGH, 2014). Em contrapartida, as vacinas por via oral, conferem estímulo na produção de células B e T específicas para o antígeno, naturalmente presente no sistema imune das mucosas, apresentando melhor desempenho em comparação com as de uso parenteral. No entanto, esse modelo de imunizante, apesar de demonstrar estudos promissores em roedores, estudos em suínos são pouco aplicados (WILSON & OBRADOVIC, 2015; IJIMA et al., 2001).

Sistema de produção, práticas de manejo, nível de infecção do rebanho, são as principais variáveis analisadas pelo produtor de suínos, para adotar o método de imunização que melhor se aplica no plantel. A estratégia mais adotada, é a vacinação de leitões com até duas doses, entretanto a dose única demonstra ser mais vantajosa, pois ao diminuir a manipulação dos animais, reduz o estresse promovido durante a imunização (BACCARO et al.,

2006; MAES et al., 2018). Estudos realizados por Sibila et al. (2007), comparando animais vacinados com duas doses (1 e 3 semanas de idade, respectivamente) e animais vacinados com dose única (6 semanas de idade), encontraram redução de lesões pulmonares de 62% e 58% respectivamente. Desta forma, levando em consideração o estresse causado nos animais e custos aplicados com mão de obra e imunizantes, o protocolo de dose única demonstra ser melhor opção.

Outro método de imunização que pode ser adotado, é a vacinação de matrizes, com finalidade de reduzir a quantidade de microrganismos excretados e aumento dos níveis de anticorpos no colostro, imunizando leitões passivamente (MAES et al., 2008; HODGINS et al., 2004; BANDRICK et al., 2014). É importante ressaltar, que a imunidade passiva dos leitões, não impede a colonização de *M. hyopneumoniae*, e altos níveis de anticorpos séricos oriundos do colostro, pode influenciar negativamente a resposta dos leitões à vacinação, à medida que, níveis baixos permite uma boa resposta imunológica após a vacinação (SIBILA et al., 2008; HODGINS et al., 2004; BANDRICK et al., 2014). É suposto que cerca de 70% do rebanho industrial suíno mundial, seja vacinado contra *M. hyopneumoniae*, à medida que o modelo de criação avança para sistemas intensivos de produção, esse percentual cresce (MARTELLI et al., 2014).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Avaliar a ocorrência de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos submetidos ao abate na Ilha de São Luís – MA.

4.2 Específicos

- Detectar e quantificar o DNA de *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmão de suínos por PCR quantitativa;
- Avaliar as lesões histopatológicas em pulmão de suínos diagnosticados com *M. hyopneumoniae*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e colheita de amostras

Foram coletadas 150 amostras de pulmão de suínos obtidos de abate fiscalizado e não fiscalizado na Ilha de São Luís, Maranhão, no período de julho de 2019 a agosto de 2021. A amostragem foi calculada pelo programa EPI-Info 6, com os seguintes parâmetros: números de animais criados no estado (600.000 cabeças); prevalência estimada de 40%, intervalo de confiança de 95% e precisão absoluta de 10%. Desta forma, foram avaliados 150 suínos por amostragem aleatória, 65 oriundos de abate fiscalizado (AF) e 85 de abate não fiscalizado (ANF).

As amostras foram coletadas em duplicata, onde um fragmento foi destinado para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), armazenado em microtubos estéreis e mantidos a -20°C para posterior processamento. O segundo fragmento foi destinado a histopatologia, sendo então armazenado para transporte em frascos contendo formalina tamponada 10%. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Molecular e Patologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da UEMA.

5.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de pulmão foi realizada utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®), conforme instrução do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro e ajustada com água ultrapura para aproximadamente $500\text{ ng}/\mu\text{L}$. A seguir, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da técnica de PCR convencional.

5.3 Reação em cadeia pela polimerase

5.3.1 PCR convencional para o gene endógeno Citocromo B (Cyt B)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA extraído, foi realizada uma reação de PCR para o gene *Citocromo B (Cyt B)*. Para tal, foram utilizados os iniciadores Cyt B1-F (CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA) e Cyt B1-R (GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA) que produzem um fragmento de 359 pares de base (pb) (STEUBER; ABDEL-RADY; CLAUSEN, 2005).

O gene mitocondrial Cyt B foi amplificado a partir de $6,25\ \mu\text{L}$ de Taq DNA Polymerase (PROMEGA®), $0,5\ \mu\text{L}$ de cada primer (10 pmol), $4,25\ \mu\text{L}$ de água ultrapura e $1\ \mu\text{L}$ de DNA (500 ng) utilizando-se o termociclador. A reação consistiu em uma desnaturação

inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 94° C durante 30 segundos, hibridização de 55°C durante 45 segundos, extensão de 72° C durante 30 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 10 minutos. Na reação, foi utilizado um controle negativo contendo água ultrapura no lugar do DNA e um controle positivo do gene Cyt B.

Quantidades iguais de DNA (4 µL) amplificado foram submetidas a eletroforese em gel de agarose. Os géis foram corados com Sybr Safe (Invitrogen®) e os fragmentos de DNA foram visualizados e documentados em fotodocumentador sob luz UV.

5.3.2 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As amostras positivas na PCR convencional anteriormente descrita baseada no gene Cyt B serão submetidas à reação de qPCR para *M. hyopneumoniae* baseada no gene p183 seguindo protocolo previamente descrito por Strait et al. (2008), utilizando os iniciadores descritos na tabela 2.

Tabela 1- Lista de iniciadores utilizados na PCR quantitativa em tempo real.

Iniciador/ sonda de hidrólise	Sequência	Tamanho do produto (pb)
Mhp183 F	5'-CCAGAACCAAATTCCTTCGCTG-3'	
Mhp183 R	5'-ACTGGCTGAACTTCATCTGGGCTA-3'	90
Mhp183 Probe	5'-FAM-AGCAGATCTTAGTCAAAGTGCCCGTG-BHQ_1-3'	

A reação foi realizada com 500 ng de DNA total, 25 pmol de cada primer e 5 pmol de sonda, utilizando o GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega®), conforme protocolo do fabricante. O programa de amplificação incluiu uma desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 20 segundos (STRAIT et al., 2008; HENRIQUES et al., 2018). A reação foi realizada no equipamento StepOnePlus 7500 (Applied Biosystems). O valor de Ct (Cycle threshold) foi utilizado para estimar a quantificação de DNA-alvo de cada amostra e para comparar com lesões histológicas.

5.4 Histopatologia

Para determinação de lesões relacionadas à infecção previamente identificada no diagnóstico molecular, as amostras de pulmão foram submetidas à histopatologia. Os fragmentos de tecido foram fixados em formalina tamponada 10% durante 24 horas e processados pelas técnicas histológicas de rotina, que incluem as etapas de desidratação em

álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. O material será seccionado na espessura de cinco micrômetros (5µm) com micrótomo de rotação HM 360 MICROM e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (BEHMER et al., 1976).

Os cortes histológicos foram fotografados através de um sistema de captura de imagem composto de câmera digital (Sony) acoplada em microscópio óptico (Zeiss). A análise das lesões microscópicas foi determinada de acordo com os achados correspondentes as principais lesões associadas à presença de *M. hyopneumoniae*, sendo broncopneumonia catarral caracterizada por grande infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no lúmen e hiperplasia de BALT (HILLEN et al., 2014).

5.5 Análise Estatística

Serão realizados os testes estatísticos de Pearson e Tukey para avaliar a correlação entre as técnicas diagnósticas utilizadas (qPCR e histopatológica). A análise estatística dos dados do qPCR será realizada usando o programa Prism vs 5.02 (Graph pad software Inc., EUA). As cópias do DNA de micoplasma das amostras de pulmão serão analisadas através da análise de variância (ANOVA) testes ($p < 0,01$).

5.6 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, protocolo de nº 020/2019.

6 RESULTADOS

Das 150 amostras coletadas, 121 apresentaram produto amplificado para o *Cyt B* no ensaio de PCR. As amostras apresentavam concentração média de DNA de 500ng/μl e parâmetros médios 260/280 e 260/230 de 1,83 e 1,85 respectivamente. O produto da amplificação do gene *Cyt B* resultou em uma única banda no gel de agarose, congruente a um fragmento de 359 pb, de acordo com os iniciadores descritos por Steuber; Abdel-Rady; Clausen (2005) (Figura 1).

Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de PCR para o gene endógeno CytB. M= Marcador de peso molecular; CN = Controle negativo; CP = Controle positivo; 1-2-3-4-6-7-8-9 = Amostras positivas; 5 = Amostra negativa.



Dessa forma, 121 amostras foram submetidas à qPCR para detecção de *M. hyopneumoniae*, das quais, 44 (36,36%) foram positivas, sendo que a quantidade de cópias de um fragmento do gene p183 variou de $1,20 \times 10^1$ a $7,20 \times 10^4$, com média de $1,73 \times 10^4$ cópias, conforme demonstrado na Tabela 2. A eficiência da qPCR variou de 100,09% a 104,08%; o coeficiente de determinação variou de 0,998 a 0,999; a inclinação variou de -3,32 a -3,228; e a interceptação do eixo y variou de 38,82 a 40,18.

Tabela 2- Quantificação média da carga bacteriana nas amostras reagentes em qPCR para *M. hyopneumoniae*.

Identificação	qPCR (Quantity Mean)	Local de Coleta*
78	$1,20 \times 10^0$	ANF
101	$1,98 \times 10^0$	ANF
107	$2,20 \times 10^0$	ANF
104	$2,49 \times 10^0$	ANF
111	$2,73 \times 10^0$	ANF

94	$3,16 \times 10^0$	ANF
149	$4,58 \times 10^0$	ANF
108	$4,60 \times 10^0$	ANF
132	$4,90 \times 10^0$	ANF
88	$5,87 \times 10^0$	ANF
102	$7,91 \times 10^0$	ANF
97	$7,95 \times 10^0$	ANF
96	$1,16 \times 10^1$	ANF
105	$1,81 \times 10^1$	ANF
148	$1,92 \times 10^1$	ANF
86	$1,99 \times 10^1$	ANF
122	$3,56 \times 10^1$	ANF
146	$3,64 \times 10^1$	ANF
129	$3,72 \times 10^1$	ANF
140	$3,97 \times 10^1$	ANF
131	$4,56 \times 10^1$	ANF
138	$5,01 \times 10^1$	ANF
93	$6,47 \times 10^1$	ANF
136	$6,73 \times 10^1$	ANF
85	$7,50 \times 10^1$	ANF
99	$8,83 \times 10^1$	ANF
130	$1,18 \times 10^2$	ANF
106	$2,14 \times 10^2$	ANF
139	$2,44 \times 10^2$	ANF
135	$5,18 \times 10^2$	ANF
150	$7,35 \times 10^2$	ANF
133	$1,00 \times 10^3$	ANF
137	$1,52 \times 10^3$	ANF
143	$5,63 \times 10^3$	ANF
134	$2,19 \times 10^4$	ANF
144	$7,20 \times 10^4$	ANF
<hr/>		
58	$4,01 \times 10^1$	AF
59	$1,12 \times 10^2$	AF
64	$5,57 \times 10^2$	AF
62	$5,71 \times 10^2$	AF
60	$5,83 \times 10^2$	AF
61	$8,14 \times 10^2$	AF
63	$1,01 \times 10^3$	AF
65	$4,93 \times 10^3$	AF

*Local de coleta: AF – Abate fiscalizado, ANF – Abate não fiscalizado

Das amostras reagentes, 81,81% (36 amostras) eram oriundas de abate não fiscalizado, enquanto que 18,18% (8 amostras) tinham origem de abate fiscalizado. Considerando os locais de coleta, a maioria das amostras reagentes para presença do DNA de *M. hyopneumoniae*, tiveram origem de abate não fiscalizado, levando em conta a ampla distribuição das carnes oriundas desse tipo de abate nas mais diversas feiras da grande Ilha, é possível demonstrar a ampla disseminação do patógeno entre os rebanhos suínos na Ilha de São Luís. A Tabela 3 mostra o percentual de amostras positivas e presença de lesões histopatológicas, de acordo com o local de coleta.

Tabela 3- Percentual de amostras positivas e presença de lesões histopatológicas características de infecção por *M. hyopneumoniae*, de acordo com o local de coleta.

Local de coleta	qPCR (<i>Mhy</i>)		Lesões Histopatológicas	
	% Positivo	Nº de amostras positivas	% amostra c/ lesões	Nº de amostras c/ lesões
Abate não Fiscalizado	81,81%	36/75	72,22%	26/36
Abate fiscalizado	18,18%	8/46	50,0%	4/8
Total	36,36%	44/121	68,18%	30/44

Na análise histopatológica, das 44 amostras positivas na qPCR, 30/44 foram apresentaram achados condizentes com processos inflamatórios, que incluíam a presença de hiperplasia de BALT, pneumócitos, edema alveolar, hemorragia, congestão e enfisema, Tabela 4. Destas, 13 amostras explicitaram todos esses achados simultaneamente, onde a hiperplasia de BALT, foi a lesão mais evidenciada na análise histopatológica, sendo a principal alteração associada à infecção por *M. hyopneumoniae* (Figura 2). Dentre as amostras analisadas 14/44 tinham lesões discretas ou não apresentavam lesões.

Tabela 4 – Principais achados histopatológicos encontrados nas amostras reagentes para *M. hyopneumoniae* em qPCR.

Amostras	Hiperplasia de BALT*				Pneumonia Intersticial**				Edema***	
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+
58	-							+++	-	
59	-				-				-	
60	-				-				-	
61			++			+			-	
62	-				-				-	
63		+					++			+
64	-				-				-	
65		+			-				-	

78	-				-				-	
85		+			-				-	
86		+				+			-	
88		+				+			-	
93				+++				+++	-	+
94			++					+++		+
96			++					+++		+
97	-				-				-	
99			++				++		-	
101				+++		+			-	
102				+++			++			+
104		+					++			+
105	-				-				-	
106				+++				+++		+
107		+			-				-	
108		+				+			-	
111		+				+			-	
122	-				-				-	
129	-				-				-	
130			++			+				+
131			++			+			-	
132	-					+			-	
133	-				-				-	
134				+++			++		-	
135		+				+			-	
136			++					+++	-	
137		+					++			+
138	-				-				-	
139	-				-				-	
140		+				+			-	
143			++					+++		+
144				+++				+++		+
146	-				-				-	
148	-					+			-	
149		+					++			+
150		+						+++		+
TOTAL	16	14	8	6	16	12	7	9	31	13
Percentual	36,36	31,81	18,18	13,63	36,36	27,27	15,90	20,45	70,45	29,54

*Hiperplasia de BALT (tecido linfoide associado ao brônquio): [-] ausente, [+] leve, [++] moderada, [+++] marcado; **Pneumonia intersticial: [-] ausente, [+] leve, [++] moderada, [+++] marcado; e ***Edema alveolar: - (ausente), + (presente).

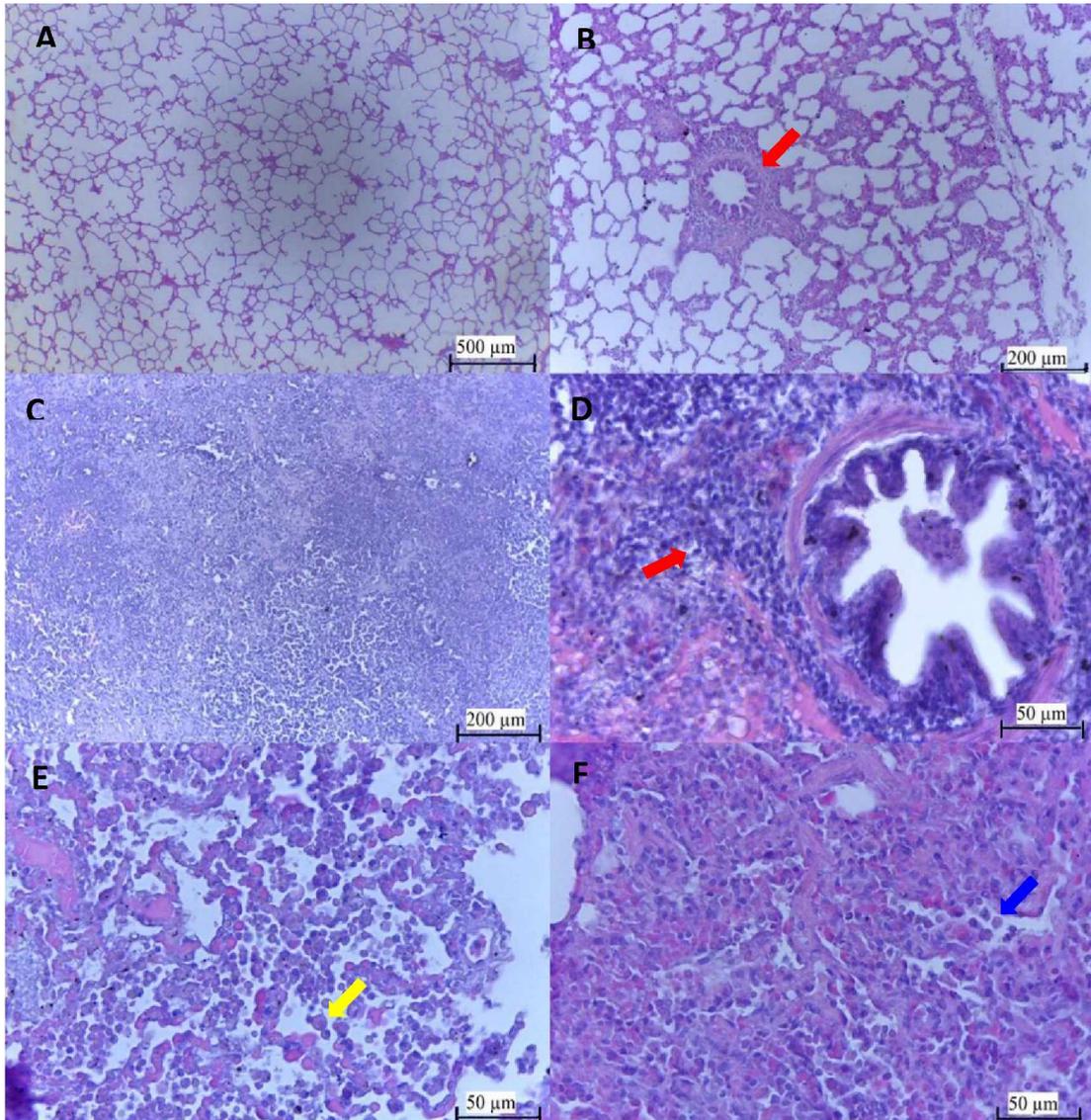


Figura 2- Corte histológico de pulmão de suíno. A, Parênquima pulmonar sem alterações (HE, objetiva de 4x, barra 500 μm); B, Discreta hiperplasia de tecido linfóide associado ao bronquíolo (seta vermelha), observa-se também discreto espessamento alveolar com células inflamatórias, (HE, objetiva de 10x, barra 200 μm); C, Difusa infiltração de células inflamatórias com perda total do parênquima pulmonar, observa-se apenas células inflamatórias, (HE, objetiva de 10x, barra 200 μm); D, Hiperplasia de tecido linfóide associado ao bronquíolo severa (seta vermelha), (HE, aumento de 40x, barra 50 μm); E, Processo inflamatório polimorfonuclear, com acentuada presença de neutrófilos segmentados e macrófagos (seta amarela), com moderada quantidade de linfócitos e hemorragia, (HE, aumento de 40x, barra 50 μm); F, Difusa inflamação mononuclear, com acentuada presença de macrófagos (seta azul), congestão vascular, (HE, aumento de 40x, barra 50 μm).

Em relação à associação entre a carga bacteriana obtida através da qPCR e as lesões histopatológicas, verificou-se que 4 das amostras com destacada lesão microscópica, também revelaram maior carga bacteriana (qPCR: $1,52 \times 10^4$; $5,63 \times 10^3$; $2,19 \times 10^4$ e $7,23 \times 10^5$). Das amostras com pouco significado microscópicos (14/44), 1 delas apresentou carga bacteriana semelhante as amostras com evidente hiperplasia de BALT. O inverso também foi observado em uma amostra com notável lesão histopatológica, onde a quantificação bacteriana apresentou-se entre as mais baixas na análise de qPCR, Tabela 5.

Tabela 5 - Quantificação média da carga bacteriana nas amostras reagentes em qPCR em comparação entre amostras sem e com maior marcação histopatológica para *M. hyopneumoniae*.

Identificação	qPCR (Quantity Mean)	Presença de Lesão microscópica
101	$1,98 \times 10^0$	+
133	$1,00 \times 10^4$	-
137	$1,52 \times 10^4$	+
143	$5,63 \times 10^4$	+
134	$2,19 \times 10^5$	+
144	$7,20 \times 10^5$	+

7 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a realizar avaliação da prevalência molecular da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos no Maranhão. A qPCR revelou taxas de positividade nos suínos amostrados (36,36%) inferiores ao relatado em outras regiões do Brasil. VICENTE et al. (2013) demonstraram percentual de positividade de 52% nos rebanhos suínos da região centro-oeste do estado de São Paulo. Em contrapartida, um estudo realizado com rebanho suíno da região Centro-Oeste e Sul do Brasil, encontrou 74% de animais reagentes para esta mesma bactéria, em amostras de animais com sinais clínicos de doenças respiratória (MORÉS et al., 2015). Na literatura não existe dados disponíveis sobre a prevalência da *M. hyopneumoniae* por país, é provável que a não restrição a comercialização da carne suína mesmo estando contaminada, seja o principal ponto de favorecimento às restritas informações (MAES et al., 2018).

A maioria das amostras positivas na qPCR (81,81%) foram provenientes de abate clandestino para comercialização em feiras livres. Os animais comercializados nas feiras livres, além de serem abatidos de forma insalubre, sem qualquer condição de higiene, são provenientes de pequenos produtores, que na maioria das vezes não possuem assistência veterinária ou qualquer orientação quanto as principais medidas sanitárias necessárias a serem aplicadas no plantel. A junção desses fatores aumenta significativamente o risco de incidência da PES, que tem como principal agente causador a bactéria *M. hyopneumoniae* (SCHWARTZ, 2001; FERRACINI e PIASSA, 2021).

Em contrapartida, de acordo com Constable et al. (2020), conjectura-se que nos abatedouros cerca de 40 a 80% dos pulmões de suíno, criados intensivamente, apresentem lesões macroscópicas características da PES. Isso ocorre devido à rápida disseminação da doença em criações com alta densidade de animais e ausência de manejo sanitário (FERRACINI; PIASSA, 2021). Em estudo realizado por Mes Ferraz et al. (2020), com 333 amostras de pulmão com lesões macroscópicas de suínos, criados em sistema intensivo no Estado de Minas Gerais, verificou-se 100% de positividade para *M. hyopneumoniae* por qPCR.

No presente estudo, somente os suínos oriundos de abatedouros eram criados de forma intensiva, apesar dessa condição de criação ser favorável à disseminação do agente etiológico, houve um menor percentual de positividade nas amostras (17,39%). Este fator se deve, provavelmente, às boas condições sanitárias aplicadas na granja. Segundo Maes et al. (2008), as principais práticas de manejo adotadas para redução da disseminação de *M. hyopneumoniae*, incluem sistema de produção “todos dentro/ todos fora”, aclimação propícia das marrãs, lotação equilibrada, prevenção de outras doenças respiratórias e ótimas condições de habitações. No entanto, todas estas práticas sendo aplicadas isoladamente ou em combinação, promovem apenas o controle parcial da bactéria (ROBBINS et al., 2019).

Os achados microscópicos encontrados nas amostras positivas para *M. hyopneumoniae* são compatíveis com a lesão causada por esta bactéria. Foi observado em 63,63% das amostras reagentes a presença de hiperplasia de BALT. Este achado é a principal lesão microscópica em decorrência da broncopneumonia catarral ocasionada por este agente infeccioso (REDONDO et al., 2009; THACKER E MINION, 2012; HILLEN et al., 2014). Uma pesquisa realizada com pulmão de suíno na fase de crescimento e terminação, coletados em abatedouro, Almeida et al. (2012) relataram que o achado microscópico de maior destaque foi a hiperplasia de BALT, evidente em 11 (73,33%) das 15 amostras avaliadas. A mesma pesquisa fez análise para qPCR, encontrando material amplificado em 100% dos swabs brônquicos. Levando em consideração que a infecção bacteriana por *M. hyopneumoniae* é a principal responsável pela PES e que esta doença é uma enfermidade de caráter crônico evolutivo (THACKER et al., 2012), é provável que as lesões microscópicas características sejam encontradas em animais com maior tempo de infecção.

Apesar da hiperplasia de BALT ser uma lesão histopatológica característica da infecção por *M. hyopneumoniae*, sendo inclusive utilizada como diagnóstico, já houve a detecção do patógeno em animais que não apresentavam estas lesões microscópicas (SORENSEN et al., 1997). A presente pesquisa confirmou a presença do DNA de *M. hyopneumoniae* em amostras pulmonares sem lesões características (36,36%) e que

apresentaram baixa carga bacteriana revelada através da qPCR. Um estudo realizado por Andrade (2018), descreve similar resultado, evidenciando o agente patológico com ausência de lesão nas amostras de pulmão. Estudos confirmam que a dose, cepa circulante e práticas de manejo, são fatores diretamente relacionados com a ocorrência da doença (VICCA et al., 2003). Além disso, o agente pode não ser definitivamente eliminado do trato respiratório do animal infectado, mesmo após a resolução das lesões pulmonares, atuando como carreador assintomático capaz de infectar outros animais (PIETERS et al., 2009).

Quando comparada a quantificação bacteriana com as lesões histopatológicas, verificou-se que as 4 amostras com maior carga bacteriana também apresentavam difusas lesões histopatológicas características da infecção por *M. hyopneumoniae*. Almeida (2019) demonstrou que existe um paralelismo positivo entre a quantificação do agente e a presença de lesão microscópica, demonstrando que a elevada carga bacteriana no tecido pulmonar está associada com intensa marcação histopatológica característica, hiperplasia de BALT. Esse processo ocorre devido à infecção promover intensa ativação dos macrófagos alveolares e linfócitos, impulsionando a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e anticorpos, produzindo assim a hiperplasia linfoide perivascular e peribronquial (BLANCHARD et al., 1992; KOBISCH E FRIIS, 1996; RODRÍGUEZ et al., 2004; CHOI et al., 2006). O avanço desse quadro inflamatório resulta na broncoconstrição e obstrução das vias aéreas, com consequente formação de lesões atelectásicas nos pulmões, podendo ser observadas macroscopicamente durante o abate ou necropsia (MAES et al., 2008; DEBLANC *et al.*, 2013; REDONDO et al., 2009; THACKER E MINION, 2012).

8 CONCLUSÕES

Esta pesquisa detectou a presença do DNA de *M. hyopneumoniae* através do exame de qPCR associada a lesões histopatológicas nos pulmões dos suínos amostrados. Esse diagnóstico revela a disseminação do agente etiológico da PES em suínos abatidos em São Luís, Maranhão. Sendo este o primeiro estudo a avaliar a prevalência desta infecção no rebanho maranhense, os achados sugerem uma maior atenção na aplicabilidade de medidas de manejo sanitário com vistas no controle e prevenção desta bactéria.

REFERÊNCIAS

- ABRA. Associação Brasileira de Reciclagem Animal. Brasil será o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína até 2018. Disponível em: <<http://abra.ind.br/blog/abra-news/brasil-sera-o-quarto-maior-produtor-e-exportador-mundial-de-carne-suina-ate-2018/>>. Acesso em: 14 fevereiro 2019.
- ALBERTON, G.C.; MORES, M.A.Z.; Interpretações de lesões no abate como ferramenta de diagnóstico das doenças respiratórias dos suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, s.1, p.95-99, 2008.
- ALMEIDA, H. M. de S. Avaliação da carga infectante de *Mycoplasma hyopneumoniae* e da imunopatologia da fase clínica da pneumonia enzoótica em suínos experimentalmente infectados. 2019. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal-Sp, 2019. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/191221/almeida_hms_dr_jabo.pdf?sequen ce=5&isAllowed=y. Acesso em: 25 nov. 2021.
- ANDRADE, MARIANA ROQUE. Patógenos Respiratórios dos Suínos: Diversidade Genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* em Minas Gerais e dinâmica de colonização e resposta imune por *Haemophilus parasuis*. 2018. 94 p. Tese de Doutorado em Ciencia Animal – UFMG. Minas Gerais, 2018.
- BACCARO, M.R.; FHIROSE, F.; UMEHARA, O.; GONÇALVES, L.C.B.; DOTO, D.S.; PAIXÃO, P.; SHINYA, L.T.; MORENO, A.M. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *The Veterinary Journal*, v.172, p.526-531, 2006.
- BANDRICK, M.; THEIS, K.; MOLITOR, T.W. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *BMC Veterinary Research*, v.10, n.124, 2014.
- BARCELLOS, D.E.S.N. et al. Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, s.1 p.87-93, 2008.
- BATISTA, L. et al. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. *Journal of Swine Health and Production*, v.12, n.2, p.75-77, 2004.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS, A. G. Neto. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: EDART, p. 239, 1976
- BENDJENNAT M, BLANCHARD A, LOUTFI M, MONTAGNIER L AND BAHRAOUI E (1999) Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. *Infect Immun* 67:4456-4462.
- BEZERRIL, J. E.; MACHADO, J. P.; SILVA, F. M. F.; BULOS, L. H. S.; VILORIA, M. I. V.; ALMEIDA, M. R. Evaluation of the co-infection caused by swine circovirus 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung samples obtained from a slaughterhouse in the Mata Mineira Region, Brazil/. *ARS Veterinária (Online)*, v. 28, p. 195, 2012.

BLANCHARD, B., VENA, M., CAVALIER, A., LE LANNIC, J., GOURANTON, J., KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, v.30, p. 329–341, 1992.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Manual Técnico. *Manual de Legislação*. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, Brasília, 2009. p.353-362.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 19 de 15 de fevereiro de 2002. Normas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. *Diário Oficial da União*, n.41, Seção 1, p. 3-5. 01 de março de 2002.

CHOI, C.; KWON, D.; JUNG, K.; HÁ, Y.; LEE, Y.H.; KIM, O.; PARK.; H.K.; KIM, S.H.; HWANG, K.K.; CHAE, C. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 40-46, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L.T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; ESTEVES, P.A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Research in Veterinary Science*, v. 87, p.157-160, 2009.

CIPRIAN A, CRUZ TA, de la Garza M. *Mycoplasma hyopneumoniae*: interação com outros agentes em suínos e avaliação de imunógenos. *Arch Med Res*. 1994; 25:235-239. ČOBANOVIĆ, N. D., KARABASIL, N. R., COJKIĆ, A. R., VASILEV, D. D., & STAJKOVIĆ, S. S., 2016. Carcass quality and hematological alterations associated with lung lesions in slaughter pigs. *Sci. P. Ani. Sci. and Biotech.*, 49, 236-240.

CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzootica suína. *Ciência Rural*, v.36, p.1034-1042, 2006.

COOK BS, BEDDOW JG, MANSO-SILVÁN L, et al. 2016. *Veterinário Microbiol* 195:158–64.

CONSTABLE, D. P. Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos e Caprinos. [s.l]: Grupo GEN, 2020. 9788527737203. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527737203/>. Acesso em: 25 nov. 2021.

DAILIDAVIČIENE, J., JANUŠKEVIČIENE, G., MILIUS, J., MIEŽELIENE, A., ALENČIKIENE, G., 2009. Influence of lung pathology on pig carcasses' microbiological quality and sensory parameters. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53, 433–438.

DEBLANC, C.; ROBERT, F.; PINARD, T.; GORIN, S.; QUEGUINER, S.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.V.; FERRE, S.; GARRAUD, J.M.; CARIOLET, R.; BRACK, M.; SIMON, G. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. *Veterinary Microbiology*, v. 162, p. 643–651, 2013.

DEE, S.; OTAKE, S.; OLIVEIRA, S.; DEEN, J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research*, v. 40, p. 30-39, 2009.

DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis e control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Journal of Swine Health e Production*, v. 32, p. 233-237, 2001.

DOŠEN, R.; PRODANOV, J.; MILANOV, D.; STOJANOV, I.; PUŠIĆ, I. The bacterial infections of respiratory tract of swine. *Biotechnology in animal husbandry*, v. 23, n. 5-6-2, p. 237-243, 2007.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 3-14, 1999.

ENGBLOM, L. et al. Sow removal in Swedish comercial herds. *Livestock science*, v. 106, n. 1, p. 76-86, 2007. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141306002472>>. Accessed: May, 17, 2020. doi: 10.1016/j. livsci.2006.07.002.

FABLET C, MAROIS-CRÉHAN C, SIMON G, GRASLAND B, JESTIN A, KOBISCH M, MADEC F, ROSE N. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. *Vet Microbiol.* 2012;157(1-2):152-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.015>. PMID:22226820.

FANO, E.; PIJOAN, C. Assessing the *Mycoplasma hyopneumoniae* infection pattern in a sow herd following na increase in the replacement rate. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 2006, St. Paul, Minesota. *Proceedings* St. Paul: University of Minnesota College of Veterinary Medicine, 2006. Accessed: Feb. 18, 2020.

FERRACINI, THAIS DE OLIVEIRA; PIASSA, MEIRIELE MONIQUE CONVATTI. Ocorrência da pneumonia enzoótica suína (pes) em leitões, alojados durante o inverno, em uma granja de crescimento/terminação localizada na cidade de Assis Chateaubriand/PR. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária* Fag, [s. l], v. 4, n. 1, p. 146-156, 2021.

FRAILE, L.; ALEGRE, A.; LOPEZ-JIMENEZ, R.; NOFRARIAS, M.; SEGALES, J. Risk factors associated with pleuritis and cranioventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary Journal*, v. 184, p. 326-333, 2010.

FRIIS, N F. “Os testes SPS e digitonina aplicados a micoplasmas suínos.” *Acta veterinaria Scandinavica* vol. 16,3 (1975): 474-6. doi:10.1186/BF03546667.

GABARDO, M.P.; ZANDONAI, A.D.; CAMARGO, M.C.; GAVA, A.; CRISTANI, J.; TRAVERSO, S.D. Caracterização sanitária de suínos criados em sistema “wean-to-finish”. *Medicina Veterinária*, v.7, p.23-31, 2013.

GIACOMINI, E., FERRARI, N., PITOZZI, A. *et al.* Dinâmica da soroconversão e infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos nos três principais sistemas de produção. *Vet Res Commun* 40, 81-88 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9657-6>.

GOODWIN, R. F. W. The phenomenon of suppressed respiratory disease in the litters of sows. *Vet. Rec.*, 77: 383-7, 1965.

GOODWIN, R.F.W.; POMEROY, A.P.; WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumoniae in pigs with a mycoplasma. *Veterinary Record*, v. 77, p. 1247-1249, 1968.

GROSSE BEILAGE, E.; ROHDE, N.; KRIETER, J. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 88, p.255-263, 2009.

HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D., DUCATELLE, R., & DECOSTERE, A. (2004). Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?. *100*, 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.002>.

HARLEY, S., MORE, S., BOYLE, L., O'CONNELL, N., HANLON, A., 2012. Good animal welfare makes economic sense: Potential of pig abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool. *Ir. Vet. J.* 65, 1-12. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-65-11>

HE, Y.; XU, M. J.; ZHOU, D. H.; ZOU, F. C.; LIN, R. Q.; YIN, C. C.; HE, X. H.; LIANG, R.; LIANG, M.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical Southern China. *Tropical Animal Health Production*, v. 43, p.695-698, 2011.

HENRIQUES, A. M., DUARTE, M., BARROS, S. C., FAGULHA, T., RAMOS, F., LUÍS, T., FEVEREIRO, M. Development and validation of a real-time PCR for the detection and quantification of porcine circovirus type 2. *Virus Disease*, v. 29, n. 3, p. 355-361, 2018.

HEIN, H. E. Pneumonia Enzoótica Suína – Revisão Bibliográfica. 2012. 35f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

HILLEN, S., VON BERG, S., KÖHLER, K., REINACHER, M., WILLEMS, H., & REINER, G. 2014. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(4), 580-588.

HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E.; DEWEY, C. E. Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, v.12, n.1, p.10-16, 2004.

IJIMA, H., TAKAHASHI, I., & KIYONO, H. (2001). Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 11(2), 117-133.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

KARABASIL, N., COBANOVIC, N., VUCICEVIC, I., STAJKOVIC, S., BECSKEI, Z., FORGÁCH, P., ALEKSICKOVACEVIC, S., 2017. Association of the severity of lung lesions with carcass and meat quality in slaughter pigs. *Acta Vet. Hung.* 65, 354–365. <https://doi.org/10.1556/004.2017.034>

KICH, J. D.; PONTES, A. P. Análise atual das doenças respiratórias no Brasil. In: Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, 2001, Porto Alegre. *Resumos*. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, p.58-67, 2001.

KOBISCH M, FRIIS NF. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech.* 1996 Dec;15(4):1569-605. doi: 10.20506/rst.15.4.983. PMID: 9190026.

LORENZO, H., QUESADA, O., ASSUNCAO, P., CASTRO, A., RODRIGUEZ, F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 109, p. 199–207, 2006.

MADSON, D. M.; PATTERSON, A. R.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X. J.; OPRIESSNIG, T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with Porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, v. 46, p. 707-716, 2009.

MAES, D., BOYEN, F., HAESEBROUCK, F., & GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. (2020). Antimicrobial treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *The Veterinary Journal*, 259, 105-474.

MAES D, SIBILA M, KUHNERT P, SEGALES J, HAESEBROUCK F, PIETERS M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. *Transbound Emerg Dis.* 2018; 65(Suppl. 1):110–24. <https://doi.org/10.1111/tbed.12677>.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary microbiology*, v. 126, n. 4, p. 297-309, 2008.

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; DE KRUIF, A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. *Vaccine*, v. 17, p.1024-1034, 1999.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly*, v.18, n.3, p.104-109, 1996.

MARE, C. J. & SWITZER, W. P. (1965). New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*; a causative agente of vírus pig pneumonia. *Vet Med Small Anim Clin* 60, 841-846.

MAROIS, C.; LE CARROU, J.; KOBISCH, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from diferente sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology*, v. 120, p.96-104, 2007.

MARTELLI, P., SALERI, R., CAVALLI, V., ANGELIS, E. DE, FERRARI, L., & BENETTI, M. (2014). Systemic and local immune response in pigs intradermally and intramuscularly injected with inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines. *Veterinary Microbiology*, 168(2–4), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.025>.

MERIALDI, G.; DOTTORI, M.; BONILAURI, P.; LUPPI, A.; GOZIO, S.; POZZI, P.; SPAQQIARI, B.; MARTELLI, P. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Veterinary Journal*, v. 193, p. 234–239, 2012.

M.E.S. FERRAZ, H.M.S. ALMEIDA, G.Y. STORINO, K. SONÁLIO, M.R. SOUZA, C.A.A. MOURA, W.M.T. COSTA, L. LUNARDI, D.C.L. LINHARES, L.G. DE OLIVEIRA, Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 182, 105091, ISSN 0167-5877, 2020, disponível em: URL.: (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587720300660>) Acesso em 25/03/22
MEYNS, T., VAN STEELANT, J., ROLLY, E., DEWULF, J., HEASEBROUK, F., MAES, D. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *The Veterinary Journal*, 187, 388–392, 2011.

MORENO, A. M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M. R. Levantamento sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. *Anais*. Belo Horizonte, 1999. P.161-162 (Resumo).

MORÉS, M.A.Z.; OLIVEIRA FILHO, J.X.; REBELLATO, R.; KLEIN, C.S.; BARCELLOS, D.E.N.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.35, n.8, p.725-733, 2015.

MORÉS, N; BARCELLOS, D; ZANELLA, J. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editora, 2 ed., p. 273-287, 2012.

MORÉS M.A.Z. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças de suínos nos abatedouros. 2006, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

MURTAUGH, M. P. (2014). Advances in swine immunology help move vaccine technology forward. *Veterinary immunology and immunopathology*, 159(3-4), 202-207.

NATHUES, H., DOEHRING, S., WOESTE, H., FAHRION, A., DOHERR, M., GROSSE BEILAGE, E. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 55, 44, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-44>.

OBOEGBULEN, S. I. Enzootic pneumonia of pigs: a review. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, v. 29, p. 269- 274, 1981.

OPRIESSNIG, T., THACKER, E. L., YU, S., FENAUX, M., MENG, X. J., & HALBUR, P. G. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 6, p. 624-640, 2004.

OPRIESSNIG T, GIMÉNEZ-LIROLA LG, HALBUR PG. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Anim Health Res Rev**. 2011 Dec;12(2):133-48. doi: 10.1017/S1466252311000120. PMID: 22152290.

OTAKE, S. et al. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. **Veterinary Microbiology**, v.145, p.198-208, 2010.

PAGOT, E., POMMIER, P., KEÏTA, A., 2007. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. **Revue de Medecine Veterinaire**, Toulouse, 158, 253–259.

PARK C, JEONG J, KANG I, et al. 2016. **BMC Vet Res** 12:25.

PEPOVICH, ROMAN, NIKOLOV, B., SIRAKOV, I., GENOVA, K., HRISTOV, K., NIKOLOVA, E., HAJIOLOVA, R., & BELTOVA, B. 2015. Clinical testing of combined vaccine against enzootic pneumonia in industrial pig farming in Bulgaria. **Macedonian Veterinary Review**, 38(2), 195–201.

PEREIRA, C.E.R.; VANNUCCI, F.A.; GABARDO, M.P.; SANTOS, L.F.; MORES, N.; GUEDES, R.M.C. *Mycoplasma hyorhinis* infection in early cases of mycoplasmal pneumonia in swine and evaluation of diagnostic assays. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, p. 1057-1063, 2017.

PERMENTIER, L., MAENHOUT, D., DELEY, W., BROEKMAN, K., VERMEULEN, L., AGTEN, S., VERBEKE, G., AVIRON, J., GEERS, R., 2015. Lung lesions increase the risk of reduced meat quality of slaughter pigs. **Meat Science**, 108, 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.06.005>

PETERSEN AC, ONEAL DC, SEIBEL JR, et al. Reatividade cruzada entre os micoplasmas suínos identificados por microarray de proteínas. **Microbiologia Veterinária**. 2016 agosto; 192:204-212. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.07.023. PMID: 27527784.

PIETERS, M.; PIJOAN, C.; FANO, E.; DEE, S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 261-266, 2009.

PIETERS, M. et al. Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. **Veterinary Microbiology**, v.172, n.3-4, p.575-580, 2014. Available from: <[https:// www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514002739](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113514002739)>. Accessed: Mar. 10, 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.027.

PIETERS, M., MAES, D., 2019. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J., KARRIKER, L., RAMIREZ, A., SCHWARTZ, K., STEVENSON, G., ZHANG, J. (Eds.), **Diseases of Swine**, Wiley, 863-883.

PIETERS M, MAES D. Micoplasmose. In: Doenças dos Suínos. 11ª edição. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2019. pág. 863-83.

RODRÍGUEZ, F.; RAMÍREZ, G.A.; SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; LORENZO, H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*, v. 130, p. 306-312, 2004.

REDONDO, E., MASOT, A.J., FERNÁNDEZ, A., GÁZQUEZ, A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology*, V.140, P. 260-270, 2009.

ROBBINS, R., BETLACH, A., MONDRAGON-EVANS, M., PIETERS, M., 2019. Desenvolvimento de um homogeneizado de pulmão específico de rebanho para exposição a *Mycoplasma hyopneumoniae* em condições de campo. *J. Suína Saúde Prod.* 27, 221-227.

ROSS, R.F. *Mycoplasmal diseases*. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELINE, W.; TAYLOR, D. *Diseases of swine*. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, p.495-510. 1999.

SCHWARTZ, K. J. O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL PFIZER DE PNEUMONIA ENZOÓTICA, 2001, Campinas. *Anais*. Campinas. p. 23-40, 2001.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, v. 164, 2012.

SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T., MAES,D., HAESEBROUCK, F., AND SEGALÉS, J. (2009) Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *J. Vet. Med.* 181: 221–231.

SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology*, v.127, p.165-170, 2008.

SIBILA, M.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 121, p. 352–356. 2007.

SIBILA, M.; NOFRARIAS, 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, n.1-2, 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, n. 3, p.221-231, 2009.

SILVA, A.F.; PAGANINI, F.J.; ACOSTA, J.C.; ROCHA, P.H.; MISTURA, H.; MARCON, E.; SIMON, V.A.; CASAGRANDE, H.A.; FLOSS, J.M. Programa de gerenciamento de

doenças respiratórias em suínos. I – Estudo do perfil das doenças respiratórias nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. *Anais do Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*, 2001, Porto Alegre, RS, Brasil.

SIQUEIRA, F. M., GERBER, A. L., GUEDES, R. L. M., ALMEIDA, L. G., SCHRANK, I. S., VASCONCELOS, A. T. R., AND ZAHA, A. (2014) Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract mycoplasmas. *PLoS One* 9: e116122.

SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS, D. Monitoramentos Clínicos. In: SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos Suínos*. 2. ed., p. 889-892. Goiânia: **Cânone Editorial**, 2012.

SOBESTIANSKY, J.; RISTOW, L. E.; MATOS, M. P. C.; BARCELLOS, D. Micoplasmoses. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.). *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cânone Editorial, 2007, p. 159-176.

SOBESTIANSKY, J.P.; MATOS, M.P.C.; HIROSE, F. Pneumonia enzoótica suína: prevalência, impacto econômico, fatores de risco e estratégias de controle. Goiânia: Art 3 *Impressos Especiais*, 2001. 43p.

SORENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; FEENSTRA, A. A.; FELD, N. C.; FRIIS, N. F.; BILLE-HANSEN, V.; JENSEN, N. E.; PEDERSEN, M. W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary microbiology*, v. 54, n. 1, p. 23-34, 1997.

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

STEVENSON, G. W. Bacterial pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham. *Proceedings* Birmingham: IPVS, 1998, P.906- 907. (Abstract).

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*. v. 46, n. 8, p. 2491-2498, 2008.

STRAW, B. E.; SHIN, S. J.; YEAGER, A. E. Effect of pneumonia on growth rate and feed efficiency of minimal disease pigs exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 9, p. 287-294, 1990.

TAKEUTI, K. L. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Veterinary Microbiology*, v.203, p.215-220, 2017a. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113517301785>>. Accessed: Mar. 20, 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.025.

TAKEUTI, K. L., DE BARCELLOS, D. E., DE ANDRADE, C. P., DE ALMEIDA, L. L., & PIETERS, M., 2017. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. *Veterinary microbiology*, 208, 18-24.

TAMIOZZO, P.; PELLIZA, B.; CARRANZA, A.; AMBROGI, A. Monitoramento da presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em granjas de suínos durante a implementação de programas de erradicação. *Ciência Rural*, v. 41, n. 4, p. 699-705, 2011.

TEIXEIRA, D. L., HARLEY, S., HANLON, A., O'CONNELL, N.E., MORE, S.J., MANZANILLA, E.G., BOYLE, L.A., 2016. Study on the association between tail lesion score, cold carcass weight, and viscera condemnations in slaughter pigs. *Front. Vet. Sci.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00024>

THACKER, E. L., MINION, C. 2012. Mycoplasmosis. In: Diseases of Swine, 10a Ed., ZIMMERMAN, J. J., KARRIKER, L. A., RAMIREZ, A., SCHWARTZ, K. J., STEVENSON, G. W. JOHN WILEY & SONS, Ames, EUA, pp. 779-797.

THACKER, E.L. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E et al. Diseases of swine. 9. ed. Australia: **Blackwell Publishing** . 2006. Cap 42. P. 701-717, 2006.

THACKER, E. L.; Mycoplasmal Disease. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. *Diseases of Swine*. 9. Ed. Iowa: Balckwell Publishing, 2006. Cap. 42, p. 701-717.

THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews*, v. 5, p. 317-320, 2004.

THACKER, E. L., THACKER, B. J., KUHN, M., HAWKINS, P. A., & WATERS, W. R. (2000). Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 61(11), 1384-1389.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; BOETTCHER, T.B.; JAYAPPA, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health and Production*, v.6, n.3, p.107-112, 1998.

TIMMERMAN, T., DEWULF, J., CATRY, B., FEYEN, B., OPSOMER, G., DE KRUIF, A., & MAES, D. (2006). Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine*, 74(4), 251–263.

VALENÇA, A.M.F.; BAPTISTA, R.I.A.A.; BARBOSA, C.N. Índice para pneumonia em granjas comerciais de suínos do estado de Pernambuco. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v.10, n.1-4, p.13-18, 2016.

VICCA J, STAKENBORG T, MAES D, et al. 2003. *Vet Microbiol.* 97:177-190.

VICENTE AF, CATTO D, ALLENDORF SD, GARCIA KCOD, ANTUNES JMAP, APPOLINARIO CM, PERES MG, MEGID J. 2013. Soropositividade para *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos abatidos em frigoríficos da região central do estado de São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec.*;65(6):1899-903. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000600045>.

VILLARREAL, I., MAES, D., VRANCKX, K., CALUS, D., PASMANS, F., HAESBROUCK, F. 2011. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*, v. 29, p. 1371–1375.

VRANCKX K, MAES D, DEL POZO SACRISTÁN R, et al. 2012. *Vet Microbiol* 156:315–321.

VRANCKX, K., MAES, D., MARCHIORO, S. B., VILLARREAL, I., CHIERS, K., PASMANS, F., & HAESBROUCK, F. (2012). Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC veterinary research*, 8, 24.

WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. (Ed.) *Veterinary Microbiology*. Massachusetts: Blackwell Science, 1999. p.165-172.

WILSON, H. L., & OBRADOVIC, M. R. 2015. Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Molecular Immunology*, 66(1), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.09.004>.

WOOLLEY, L.K., FELL, S., GONSALVES, J.R., WALKER, M.J., DJORDJEVIC, S.P., JENKINS, C., EAMENS, G.J. 2012. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet. Microbiol.* 161, 186–195. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.025.

WU, C.C.; SHRYOCK, T.R.; LIN, T.L.; VEENHUIZEN, M.F. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. *Swine Health and Production*, v.5, n.6, p.227-230, 1997.

YOUNG, T.F.; THACKER, E.L.; ERICKSON, B.Z.; ROSS, R.F. A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 269- 279, 2000.