

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Isolamento e prevalência de *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos obtidas de frigorífico do sul do Rio Grande do Sul

Violetta Dias Pacce

Pelotas, 2017

VIOLETTA DIAS PACCE

Isolamento e prevalência de *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos obtidas de frigorífico do sul do Rio Grande do Sul

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Orientadora de estágio: MSc. Natasha Rodrigues de Oliveira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P114i Pacce, Violetta Dias

Isolamento e prevalência de *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos obtidas de frigorífico do sul do Rio Grande do Sul / Violetta Dias Pacce ; Odir Antonio Dellagostin, orientador. — Pelotas, 2017.

46 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2. Isolamento. 3. Prevalência. I. Dellagostin, Odir Antonio, orient. II. Título.

CDD : 636.40896241

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sérgio Jorge, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Vanessa Galli, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (orientador)

Agradecimentos

À minha mãe, por todo o sacrifício, amor e apoio incondicional durante cada etapa da minha vida, incluindo o curso de graduação, e ao meu irmão por ser a pessoa que é. Se não fosse por vocês nada disso seria possível;

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores do curso de Graduação em Biotecnologia, por todos os ensinamentos e uma graduação de qualidade;

Ao meu orientador Odir Antônio Dellagostin, pela oportunidade de estágio, orientação, incentivo e por ser um exemplo de competência e profissionalismo;

À minha orientadora de estágio e acima de tudo amiga, Natasha, por toda a dedicação, confiança e paciência comigo. Obrigada por não medir esforços em me ajudar, pela disponibilidade (que foi além dos turnos do dia, se estendendo a noite via whatsapp), pelos ensinamentos, pelas conversas, risadas e companheirismo no trabalho. Não poderia ter escolhido orientadora melhor!

Ao amigo e também orientador, Sérgio Jorge, por toda dedicação e grande ajuda durante o planejamento e desenvolvimento deste trabalho;

Aos demais colegas do Laboratório de Vacinologia, Thaís, Michele, Amanda, Mara, Carol e Tom, por tornar o ambiente de trabalho muito mais amigável e divertido. E mesmo de longe, ao Charles, por me admitir como estagiária do laboratório no início da graduação e repassar seus conhecimentos a mim;

Às professoras e amigas, sem palavras pra agradecer o tempo e disposição. Priscila, obrigada por toda a ajuda, conselhos e por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu não acreditei; e Bilica, obrigada por me acolher e confortar nos momentos de desespero. Vocês são as melhores!

Aos meus amigos e colegas da ATBIOTEC2017, especialmente Laura, Aishe, Yasmine e Lucas, por dividirem comigo essa trajetória das nossas vidas, e tornar até mesmo os momentos mais difíceis divertidos. Obrigada por tudo, principalmente pela amizade, que não se finaliza com a graduação;

À minha melhor amiga, Laura Azevedo, pelo apoio incondicional. Obrigada por estar comigo nas alegrias, tristezas e conquistas, e por sempre acreditar no meu potencial. E aos meus grandes amigos, Henrique e Luiza, obrigada por sempre estarem ao meu lado e entenderem minha ausência, vocês são especiais;

E a todos que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

PACCE, Violetta Dias. **Isolamento e prevalência de *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmão de suínos obtidas de frigorífico do sul do Rio Grande do Sul.** 2017. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), doença altamente prevalente e mundialmente distribuída, causando grandes perdas econômicas para a indústria suinícola. A bactéria coloniza e paralisa as células epiteliais do trato respiratório suíno, predispondo os animais ao desenvolvimento de infecções secundárias e oportunistas. A progressão da doença é caracterizada pela redução das taxas de conversão alimentar e o desenvolvimento de lesões pulmonares. O diagnóstico da PES é usualmente realizado por ELISA indireto, porém, métodos diretos mais sensíveis, como o *Nested-PCR* pode ser realizado. Já o isolamento do agente é dificultado pelo crescimento fastidioso e pela contaminação com a presença de outras espécies do gênero. Contudo, o isolamento e a caracterização molecular de cepas de *M. hyopneumoniae* regionalmente circulantes contribuem para medidas profiláticas efetivas no controle desta enfermidade. Neste contexto, os principais objetivos desse trabalho foram realizar o isolamento do *M. hyopneumoniae* e determinar sua prevalência em amostras de pulmões suínos oriundos de diferentes granjas do estado do Rio Grande do Sul. Para o isolamento e avaliação da prevalência, um total de 120 amostras foram coletadas e processadas. O DNA foi extraído do tecido pulmonar para realização de *Nested-PCR*. Por fim, os pulmões foram inspecionados para presença de lesões macroscópicas sugestivas de *M. hyopneumoniae*. Nas amostras cultivadas, duas apresentaram um padrão de crescimento característico da bactéria, o qual foi confirmado por PCR. No *Nested-PCR*, 95,83% das amostras foram positivas para o patógeno. A análise do *score* pulmonar mostrou lesões sugestivas da PES em 60% das amostras. Os isolados obtidos serão posteriormente caracterizados e sequenciados a fim de se conhecer a sua diversidade genética. Os dados obtidos neste trabalho demonstram a alta prevalência da PES em granjas do RS.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*; isolamento; prevalência.

Abstract

PACCE, Violetta Dias. **Isolation and prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine lung samples obtained from a slaughterhouse in southern Rio Grande do Sul.** 2017. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of Enzootic Pneumonia (EP), a disease that is highly prevalent and globally distributed, causing significant economic losses to the swine industry. The bacterium colonizes the ciliated epithelial cells of the respiratory tract, damaging the cells and predisposing the infected animals to secondary infections. The disease progression is characterized by reduced feed conversion and the development of lung lesions. EP diagnosis is usually performed by indirect ELISA, however more sensitive direct methods such as Nested-PCR can also be used. Isolation of the agent is hampered by its fastidious growth and by contamination with the presence of other *Mycoplasma* species. However, the isolation and molecular characterization of *M. hyopneumoniae* regional circulating strains contributes to effective prophylactic measures to control this disease. In this context, the main objectives of this study were to isolate *M. hyopneumoniae* and determine its prevalence in swine lung samples from different farms in Rio Grande do Sul state. For isolation, 120 samples were collected and processed. DNA was extracted from lung tissue to perform Nested-PCR. Lastly, lungs were inspected to evaluate the presence of suggestive lung lesions of *M. hyopneumoniae*. In cultivated samples, two of them showed a characteristic growth pattern of this bacterium, which was later confirmed by PCR. In Nested-PCR, 95,83% of samples were positive to this pathogen. Lung lesion score analysis showed suggestive lesions in 60% of samples. The isolates will later be characterized and sequenced for the purpose of knowing its genetic diversity. Data found in this study demonstrate high prevalence of EP in animals from farms in Rio Grande do Sul.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; isolation; prevalence.

Lista de figuras

Figura 1	Exemplo de pulmões com (A) e sem lesões sugestivas da PES (B).....	26
Figura 2	Diagrama pulmonar utilizado no método de <i>score</i> de Hannan et al., 1982.....	27
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras positivas na PCR para o gênero <i>Mycoplasma</i>	33
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras 1 a 30 no <i>Nested-PCR</i>	34
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras 31 a 60 no <i>Nested-PCR</i>	34
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras 61 a 90 no <i>Nested-PCR</i>	35
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras 91 a 120 no <i>Nested-PCR</i>	35

Lista de tabelas

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> utilizados no PCR para detecção do gênero <i>Mycoplasma</i>	28
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> utilizados no <i>Nested-PCR</i>	29
Tabela 3	Panorama geral acerca dos resultados do <i>score</i> * pulmonar, isolamento e detecção por <i>Nested-PCR</i>	30
Tabela 4	Resultados do <i>Nested-PCR</i> e <i>scores</i> pulmonares.....	34

Lista de abreviaturas e siglas

AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
BHI	Infusão Cérebro Coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CPVC	Consolidação pulmonar cranioventral (<i>Cranioventral Pulmonary Consolidation</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensaio de absorção imunoenzimático (<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ISH	Hibridização <i>in situ</i> (<i>in situ Hybridization</i>)
kb	quilobases
PES	Pneumonia Enzoótica Suína
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed-field Gel Eletrophoresis</i>)
pH	Potencial hidrogênico
PRDC	Complexo de Doenças Respiratórias Suínas (<i>Porcine Respiratory Disease Complex</i>)
PRRSV	Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória de Suínos (<i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus</i>)
RAPD	DNA Polimórfico amplificado aleatoriamente (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
SIV	Vírus da Influenza Suína (<i>Swine Influenza Virus</i>)
VNTR	Repetições em <i>tandem</i> de número variável (<i>Variable Number Tandem Repeat</i>)

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. Revisão de literatura.....	15
3.1 O gênero <i>Mycoplasma</i>	15
3.2 O agente <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	16
3.3 Pneumonia Enzoótica Suína.....	17
3.4 Epidemiologia e transmissão.....	19
3.5 Diversidade genética.....	20
3.6 Testes diagnósticos.....	21
3.7 Controle e prevenção.....	23
4. Metodologia.....	26
4.1 Coleta de amostras.....	26
4.2 Score de lesões pulmonares.....	27
4.3 Cultivo, isolamento e detecção do agente.....	27
4.4 Extração de DNA e <i>Nested-PCR</i>	28
4.5 Análise estatística.....	29
5. Resultados.....	30
5.1 Score de lesões pulmonares.....	30
5.2 Cultivo e isolamento.....	33
5.3 Diagnóstico por <i>Nested-PCR</i>	33
6. Discussão.....	36
7. Conclusão.....	39
8. Referências.....	40

1. Introdução

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES) (THACKER; MINION, 2012). A PES é caracterizada por tosse crônica não produtiva, redução das taxas de crescimento, piora da conversão alimentar e retardo no ganho de peso, apresentando alta morbidade e baixa mortalidade (VRANCKX et al., 2012). Além disso, infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae* geram significativas perdas econômicas, direta ou indiretamente, através do aumento da susceptibilidade dos suínos a outros patógenos respiratórios (MAES et al., 2017).

A PES é altamente prevalente (variando entre 65% e 93,6%), sendo distribuída em quase todas as áreas de produção suinícola do mundo (FABLET et al., 2012; GROSSE BEILAGE; ROHDE; KRIETER, 2009). O microrganismo pode se manter no trato respiratório de animais classificados como carreadores, mesmo sem o desenvolvimento da doença. Animais em fase de crescimento e terminação são mais afetados e a severidade dos sinais clínicos pode ser influenciada por diversos fatores, como a virulência da cepa, o número de microrganismos presentes, ocorrência de infecções secundárias e as condições de manejo (SIBILA et al., 2009).

Diversas metodologias são utilizadas para diagnosticar a infecção. Sinais clínicos e lesões patológicas são considerados de diagnóstico presuntivo, sendo necessários testes laboratoriais para obtenção de um diagnóstico conclusivo (SIMIONATTO et al., 2013). O isolamento do *M. hyopneumoniae* é considerada o padrão ouro para a confirmação do diagnóstico (THACKER, 2004). Porém, o isolamento desse patógeno é fastidioso, requerendo um longo período de incubação, além da constante contaminação com outros micoplasmas também presentes no trato respiratório suíno (MAES et al., 2017). Métodos para detecção de anticorpos como testes de ELISA (Ensaio de Absorção Imunoenzimático) e Imunofluorescência indireta são bastante utilizados, mas apresentam baixa sensibilidade e reações cruzadas com outros micoplasmas (NETO et al., 2014).

O desenvolvimento de ensaios de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) forneceram métodos de detecção mais sensíveis e específicos, que podem ser utilizados em amostras de tecido pulmonar, *swab* nasal ou lavagens bronquiais

(THACKER; MINION, 2012). O *Nested-PCR*, consiste em uma variação do PCR convencional e vem sendo utilizado para aumentar a sensibilidade do diagnóstico, uma vez que utiliza dois conjuntos de *primers* específicos para o gene do RNA ribossomal 16S de *M. hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999; YAMAGUTI; MULLER; PIFFER, 2008)

Para fins de controle da infecção, vacinas comerciais baseadas em bacterinas são mundialmente utilizadas nos rebanhos de produção intensiva, possibilitando a melhoria dos índices produtivos (HAESEBROUCK et al., 2004). Entretanto, as mesmas oferecem apenas proteção parcial contra a doença. Assim, uma estratégia mais efetiva de contenção da infecção requer a associação da vacinação com melhorias nas técnicas de manejo e uso de antimicrobianos (MAES et al., 2008; SIBILA et al., 2009). A presença de diferentes cepas e/ou diferenças na virulência encontradas entre isolados de *M. hyopneumoniae* nos rebanhos produtivos podem contribuir para o agravamento das infecções e em falhas no controle da doença (MICHIELS et al., 2017). Logo, o isolamento e caracterização de micoplasmas associados a problemas respiratórios, possibilitam o desenvolvimento de estudos epidemiológicos e moleculares que auxiliam na compreensão dos mecanismos associados à patogênese da doença e no estabelecimento de medidas de controle. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo o isolamento e determinação da prevalência do *M. hyopneumoniae* em amostras de suínos no sul do Rio Grande do Sul.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

- Isolar o *M. hyopneumoniae* e determinar sua prevalência em amostras de pulmão de suínos abatidos no sul do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras clínicas de pulmão de suínos abatidos em frigorífico da zona Sul do Rio Grande do Sul;
- Cultivar o *M. hyopneumoniae* a partir das amostras pulmonares obtidas dos suínos;
- Determinar a prevalência de *M. hyopneumoniae* nas amostras por *Nested-PCR*;
- Isolar cepas de *M. hyopneumoniae*.

3. Revisão de literatura

3.1 O gênero *Mycoplasma*

Os micoplasmas pertencem à classe *Mollicutes* (*mollis*, mole; *cutis*, pele, em Latim), ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* (WALKER, 2003). Essa classe representa um grupo de bactérias desprovidas de parede celular e que infectam uma grande variedade de plantas e animais (THACKER; MINION, 2012). Os mollicutes de maior interesse na área veterinária são encontrados entre os gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Eperythrozoon* e *Haemobartonella* (YAMAGUTI, 2009), sendo o gênero *Mycoplasma* o maior da classe *Mollicutes*, com mais de 107 espécies e subespécies descritas (JOHANSSON; PETTERSSON, 2002). Infecções por micoplasmas são relacionadas com a presença de carreadores assintomáticos, que podem ou não desenvolver a doença. Essas normalmente são doenças subclínicas, de progressão lenta ou crônica (CITTI; BLANCHARD, 2013). O estabelecimento de infecções crônicas aparece devido à capacidade que esses organismos têm de alterar seus antígenos de superfície, conseguindo assim evadir a resposta imune do hospedeiro (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006).

Os micoplasmas apresentam uma morfologia pleomórfica devido à ausência de parede celular. Em sua forma esférica, o diâmetro varia de 0,3 a 0,8 µm. Sua estrutura consiste em uma membrana trilaminar composta por proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, fosfolipídios e colesterol, que fornece estabilidade osmótica e rigidez (WALKER, 2003).

De todos os organismos celulares, os micoplasmas são os que apresentam o menor tamanho de genoma, podendo ter até menos de 600 kb (DYBVIK; VOELKER, 1996). O genoma desses organismos tem características peculiares, como um baixo conteúdo de guanina e citosina (24-32 mol%) (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998), e a tradução do códon UGA em triptofano ao invés de um códon de parada, como acontece normalmente em outros organismos (DYBVIK; VOELKER, 1996). Porém apesar dessas diferenças, muitos aspectos da biologia molecular dos micoplasmas são semelhantes aos das bactérias gram-positivas (THACKER; MINION, 2012).

Devido à capacidade limitada de codificação do seu genoma, os micoplasmas não possuem muitas rotas enzimáticas características da maioria das bactérias, o

que conseqüentemente faz com que as células precisem obter aminoácidos, purinas, pirimidinas e componentes de membrana do seu ambiente de crescimento (DYBVIK; VOELKER, 1996). Dessa maneira, o crescimento desses microrganismos *in vitro* é bastante fastidioso (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

3.2 O agente *Mycoplasma hyopneumoniae*

O *Mycoplasma hyopneumoniae* dá início a uma broncopneumonia insidiosa crônica conhecida como Pneumonia Enzoótica Suína (PES). A infecção suprime a imunidade inata e adquirida do sistema respiratório dos animais afetados, permitindo assim que o patógeno sobreviva e prolifere aderido às células do hospedeiro, bem como que outras bactérias proliferem nos pulmões agravando ainda mais a doença (THACKER; MINION, 2012).

A maioria das espécies de micoplasmas nunca foram cultivadas *in vitro*. Por outro lado, *M. hyopneumoniae* é cultivado, com a exigência de meio de cultivo enriquecido (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Esse meio foi desenvolvido por Neils Friis (1975), o qual é geralmente composto por Infusão Cérebro Coração (BHI), peptona, extrato de levedura e soro animal suplementado. O soro tem mostrado fornecer dentre outros nutrientes, ácidos graxos e colesterol, sendo esse último usado para síntese da membrana plasmática (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). As condições ideais para o crescimento dessa bactéria são uma temperatura ótima de 37 °C, pH próximo de 7.5, atmosfera de 5% a 10% de dióxido de carbono (CO₂) e leve agitação (WALKER, 2003).

Em cultura, o *M. hyopneumoniae* cresce mais lentamente comparado a outros micoplasmas que infectam suínos. A multiplicação bacteriana é indicada pela mudança de coloração no meio de cultivo que varia de vermelho para amarelo, resultante da acidificação do meio. Esse processo leva em torno de 30 dias após sua inoculação, e está relacionado à dependência do microrganismo em obter determinados nutrientes e às condições ambientais (COOK et al., 2016; THACKER, 2004). Quando inoculado em meio de cultivo sólido e incubado em ambiente 5-10% de CO₂, resulta em colônias após 2-3 dias de incubação (THACKER; MINION, 2012).

O cultivo e isolamento do *M. hyopneumoniae* é lento e complexo. A contaminação com outras bactérias ou micoplasmas, como *M. hyorhinis* (presente

no trato respiratório suíno) e *M. flocculare* (espécie não-patogênica que apresenta similaridades com *M. hyopneumoniae* em sua morfologia, crescimento e antigenicidade), frequentemente dificultam a cultura e um isolamento de sucesso (SIMIONATTO et al., 2013; THACKER; MINION, 2012). Entretanto, um trabalho recente realizado por Cook e colaboradores (2016) apresentou soluções para o controle do crescimento bacteriano, com a intenção de permitir que colônias isoladas sejam distinguidas e selecionadas, bem como o melhoramento do meio para a supressão do *M. hyorhinis*. Neste trabalho, os autores aperfeiçoaram o meio Friis (1975) através do uso de ágar purificado e incorporação de DEAE-Dextran, um derivado policatiônico do polímero dextrana. A inclusão do DEAE-Dextran no ágar purificado aumentou o crescimento de colônias das cepas de *M. hyopneumoniae* (COOK et al., 2016). Além disso, foram testados quatro antibióticos diferentes, e dentre estes, a canamicina mostrou-se mais eficaz em combater o crescimento de *M. hyorhinis* permitindo apenas o crescimento do *M. hyopneumoniae*.

Nesse sentido, o melhoramento do meio de cultivo e dos métodos de isolamento do *M. hyopneumoniae* apresenta importância significativa, pois permite melhoria das coleções de cepas, o que pode contribuir muito para a pesquisa, diagnóstico, produção de vacinas, e avaliação de testes de sensibilidade antimicrobiana com este patógeno (MAES et al., 2017).

3.3 Pneumonia Enzoótica Suína

As doenças respiratórias ocupam lugar de destaque dentro das infecções que afetam suínos e são um grande problema enfrentado pela suinocultura intensiva mundial (YAMAGUTI, 2009). Uma vez que a etiologia das doenças respiratórias é complexa e multifatorial, o termo Complexo de Doenças Respiratórias Suínas (PRDC) é comumente utilizado. Efetivamente, diversas bactérias e vírus estão envolvidos no desenvolvimento de lesões pulmonares (FABLET et al., 2012). Os patógenos mais comuns relatados são o Circovírus suíno tipo 2 (PCV2), Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória de Suínos (PRRSV), Vírus da Influenza Suína (SIV), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *M. hyopneumoniae* (THACKER; MINION, 2012). Apesar das doenças respiratórias serem induzidas por microorganismos de forma individual, já foi reportado que bactérias e vírus

trabalham de forma sinérgica aumentando a severidade dessas patologias (CHOI; GOYAL; JOO, 2003).

Clinicamente, a PES é caracterizada por tosse crônica não produtiva, redução das taxas de crescimento, piora da conversão alimentar e retardo no ganho de peso, apresentando alta morbidade e baixa mortalidade (VRANCKX et al., 2012). A queda da produtividade pode chegar a 20% sobre a conversão alimentar e 30% sobre o ganho de peso do animal, o que juntamente com o uso de antimicrobianos para o controle da infecção acarreta em significativas perdas econômicas (SOBESTIANSKY, 1999). A ocorrência, o curso e a severidade da PES em suínos que abrigam *M. hyopneumoniae* no seu trato respiratório são influenciados por uma série de fatores, como a virulência de cepas e infecções secundárias causadas por outros patógenos de via respiratória (MICHIELS et al., 2017; NATHUES et al., 2016).

De modo geral, suínos de qualquer idade podem contrair infecção. Entretanto, em granjas endemicamente infectadas, os suínos adultos são apenas reservatórios do patógeno (NATHUES et al., 2016), enquanto os sinais clínicos da PES são observados principalmente em suínos nas fases de crescimento e de terminação (MAES et al., 2017).

O evento inicial na patogenia da PES é a adesão do *M. hyopneumoniae* no trato respiratório suíno, seguido de indução da ciliostase e perda dos cílios (DEBEY; ROSS, 1994). Outros mecanismos de ação desse patógeno incluem a estimulação de uma reação inflamatória prolongada e a supressão e modulação das respostas imune inata e adaptativa (THACKER; MINION, 2012). Como resultado, os suínos infectados são mais susceptíveis às infecções causadas por outros patógenos respiratórios.

O mecanismo específico de aderência do *M. hyopneumoniae* no trato ciliar ainda não foi completamente elucidado. Porém, algumas proteínas envolvidas nesse processo já foram identificadas (SIMIONATTO et al., 2013). Uma delas é a adesina P97, que reconhece receptores glicolipídicos sulfatados presentes nos cílios das células epiteliais do trato respiratório suíno (ZHANG et al., 1995). A porção C-terminal da P97, conhecida como R1, é responsável pela ligação nos cílios, e oito unidades de repetição de R1 são necessárias para esse processo (MINION; ADAMS; HSU, 2000). Estudos sugerem que a proteína P102 tem participação na virulência do patógeno, já que é expressa *in vivo* durante a infecção (ADAMS; PITZER; MINION, 2005). Foi demonstrado também que essa proteína possui

habilidades multifuncionais de ligação, capaz de recrutar plasminogênio e fibronectina para a superfície do *M. hyopneumoniae* (SEYMOUR et al., 2010).

Já foi demonstrado que o *M. hyopneumoniae* tem efeito modulatório no sistema imune. Macrófagos alveolares e linfócitos, estimulados por esse patógeno, produzem citocinas pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento das lesões pulmonares e hiperplasia linfoide (BIN et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2004). As lesões macroscópicas em suínos afetados pela PES consistem em consolidação pulmonar cranioventral, que são áreas púrpuro-acinzentadas geralmente distribuídas nos lobos craniais, intermediários e acessórios do pulmão (GARCIA-MORANTE et al., 2016). Em caso de simultaneidade de infecções bacterianas, os animais apresentam lesões mais graves com maior proporção de tecido afetado. Em lesões recuperadas, formação de tecido conjuntivo pode ser observada (THACKER; MINION, 2012).

3.4 Epidemiologia e transmissão

A avaliação de doenças respiratórias em um rebanho por *scoring* de lesões pulmonares, durante a inspeção do abate, é frequentemente utilizada para estimar a prevalência da PES. O pulmão de no mínimo 30 animais deve ser avaliado a fim de fornecer uma medida confiável de prevalência e severidade da PES em rebanhos (SIBILA et al., 2009). Estima-se que 90% dos rebanhos suínos no mundo são infectados pelo *M. hyopneumoniae*, sendo que 40-50% desses animais apresentam lesões pulmonares no abate (BURCH, 2004). Recentemente, Siqueira e colaboradores (2017) realizaram uma análise metagenômica do DNA de pulmões de suínos mantidos em condições de campo no sul do Brasil e demonstraram que o *M. hyopneumoniae* é o patógeno mais prevalente no microbioma desses animais. Esses dados podem explicar a ampla disseminação desse microrganismo nos rebanhos suínos.

A infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* apresenta distribuição geográfica mundial. A prevalência é baixa em alguns países escandinavos, e a Suíça é considerada livre de *M. hyopneumoniae* após a aplicação de um programa nacional de erradicação. Entretanto, alguns surtos esporádicos são observados sem conhecimento da fonte de infecção (STÄRK et al., 2007). Dados específicos da prevalência de cada país não são disponíveis na literatura, devido ao fato da doença

não ser considerada de notificação obrigatória e não ser limitante para as trocas comerciais (MAES et al., 2017).

A introdução do *M. hyopneumoniae* nos rebanhos pode ocorrer de maneira direta através do contato com secreções respiratórias de animais portadores ou indireta pela transmissão de aerossóis. Uma vez no rebanho, o agente é propagado entre os animais através de gotículas de aerossol geradas por tosse ou espirro. A transmissão pode ocorrer de forma vertical através do contato nasal entre as fêmeas e sua prole ou horizontalmente entre suínos infectados e sadios (MAROIS et al., 2007; SIBILA et al., 2008). Além disso, já foi relatado que a transmissão do *M. hyopneumoniae*, via gotículas de aerossol, pode ocorrer entre rebanhos com até 9,2 km de distância (OTAKE et al., 2010).

Além da presença do agente etiológico, as características e o manejo de um rebanho, o tipo de locação, a inserção de novos animais no rebanho e a qualidade do ar também são considerados importantes fatores de risco associados às doenças respiratórias em suínos (MEYNS et al., 2011). Outro aspecto crítico da epidemiologia de *M. hyopneumoniae* é o longo período de persistência do patógeno, cujos fatores determinantes ainda não são bem compreendidos (MAES et al., 2017).

3.5 Diversidade genética

As condições ambientais e de manejo são de importância significativa, mas outros fatores também podem determinar o padrão da infecção (VICCA et al., 2003). Alta heterogeneidade genética tem sido previamente demonstrada entre isolados de *M. hyopneumoniae* com a utilização de várias técnicas como RAPD (ARTIUSHIN; MINION, 1996), AFLP (KOKOTOVIC et al., 1999) e PFGE (STAKENBORG et al., 2005). Entretanto, a técnica de RAPD apresenta baixas taxas de reprodutibilidade, e os métodos AFLP e PFGE são considerados laboriosos. Assim, novas técnicas baseadas na amplificação do DNA têm sido desenvolvidas nos últimos anos. A análise VNTR e a PCR combinada com RFLP são duas abordagens de fácil execução, reprodutíveis e com alto poder discriminatório (CHARLEBOIS et al., 2014).

Técnicas moleculares têm demonstrado que o *M. hyopneumoniae* apresenta uma grande diversidade genômica, proteômica, fenotípica e também de virulência (CALUS et al., 2007; CHARLEBOIS et al., 2014; FREY; HALDIMANN; NICOLET,

1992; NATHUES et al., 2011; STAKENBORG et al., 2006a). Alguns isolados foram classificados como de baixa, moderada e alta virulência com base nos resultados de infecções experimentais em suínos (VICCA et al., 2003). Até o presente momento, nove cepas de *M. hyopneumoniae* já tiveram seus genomas completamente sequenciados (HAN et al., 2017; KAMMINGA et al., 2017; LIU et al., 2011, 2013; MINION et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2005). A análise comparativa desses genomas tem permitido a identificação de vias metabólicas, fatores de virulência, mutações, entre outras características que podem estar envolvidas no processo de patogênese da bactéria.

As cepas consideradas de alta virulência tem maior capacidade de colonizar o epitélio ciliado e/ou se multiplicar mais rapidamente resultando em mais microrganismos, causando tosse, lesões macroscópicas e microscópicas mais severas (VICCA et al., 2003). Estudos já demonstraram a presença de mais de uma cepa de *M. hyopneumoniae* em um mesmo rebanho e até em um mesmo animal (NATHUES et al., 2011). Além disso, infecções simultâneas ou subsequentes com múltiplas cepas podem resultar em lesões pulmonares mais graves (MICHIELS et al., 2017; VRANCKX et al., 2011). As cepas distintas que circulam no ambiente são uma fonte adicional da variabilidade que diz respeito à epidemiologia de *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2017) e a proximidade de diferentes granjas pode contribuir para a introdução de novas cepas de *M. hyopneumoniae* em uma granja, resultando no aumento da heterogeneidade entre isolados (CHARLEBOIS et al., 2014).

Trabalhos visando à caracterização antigênica de cepas locais também são essenciais para seleção de antígenos vacinais adequados. Porém são escassos e dificultados pela natureza fastidiosa do microrganismo (CONCEIÇÃO; DELLAGOSTIN, 2006).

3.6 Testes diagnósticos

Um diagnóstico presuntivo pode ser formulado através dos sintomas clínicos como tosse, febre e lesões pulmonares macroscópicas e microscópicas (MAES et al., 2017), porém as últimas não são patognomônicas do *M. hyopneumoniae* (THACKER; THACKER; JANKE, 2001). Logo, testes laboratoriais são necessários para um diagnóstico conclusivo.

O método considerado “padrão-ouro” para a detecção de *M. hyopneumoniae* em tecidos pulmonares é o isolamento (THACKER; MINION, 2012). Entretanto, é uma técnica laboriosa, que requer um tempo de crescimento de 4-8 semanas, e as culturas são frequentemente contaminadas por outros micoplasmas como *M. hyorhinis* e *M. flocculare* (SIBILA et al., 2009). Sendo assim, não é uma abordagem realizada em diagnósticos rotineiros, e a falha em isolar esse microrganismo não pode ser considerada como base de conclusão para a ausência do mesmo (THACKER; MINION, 2012).

Os testes sorológicos são normalmente aplicados para detectar a presença da infecção a nível de rebanho (SIBILA et al., 2009). Anticorpos circulantes em suínos que foram expostos ao *M. hyopneumoniae* podem ser detectados em torno de 3 a 6 semanas após a infecção inicial (THACKER; MINION, 2012). O teste de ELISA é um método rápido, barato e facilmente automatizado, que fornece a informação da presença de anticorpos, bem como o tempo requerido para a soroconversão (SIBILA et al., 2009). Porém, a presença de anticorpos maternos nas primeiras semanas de vida e a ocorrência de reações cruzadas com determinantes antigênicos de outros micoplasmas são alguns limitantes dessa técnica (NETO et al., 2014). Além disso, a mesma não consegue diferenciar os suínos naturalmente infectados dos vacinados (MAES et al., 2017).

Técnicas como Imunofluorescência e Imunohistoquímica para a detecção do *M. hyopneumoniae* são consideradas rápidas e com maior especificidade, mas também sofrem com baixa sensibilidade principalmente quando o número de micoplasmas presente nos tecidos respiratórios é muito baixo (THACKER; MINION, 2012). Além disso, estas técnicas utilizam secções de tecido pulmonar, o que pode ser considerado um fator limitante, uma vez que apenas pequenas partes do tecido podem ser avaliadas, gerando falsos negativos (MAES et al., 2017).

Com o avanço dos métodos moleculares, as técnicas baseadas em anticorpos estão sendo substituídas (STAKENBORG, 2005). O desenvolvimento de ensaios de PCR forneceu um método de confirmação para *M. hyopneumoniae* sensível e específico, com a possibilidade de utilização de diversas amostras. Tecido pulmonar, *swab* bronquial, ou lavagens bronquiais são as mais comumente utilizadas (THACKER; MINION, 2012). Além disso, o PCR não depende da bactéria em sua forma viável, então pode ser realizado em animais vivos ou mortos (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999).

Uma das variações da técnica é o *Nested-PCR*, que utiliza dois conjuntos de *primers* específicos para amplificar o gene do RNA ribossomal 16S. Esse ensaio demonstra ser uma ferramenta útil tanto para o diagnóstico da doença como para detecção de animais carreadores, sendo eficiente também para verificar o *status* sanitário dos animais recebidos para reposição (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999). Além do *Nested-PCR*, ensaios de Multiplex-PCR também foram desenvolvidos para identificar múltiplos micoplasmas em uma mesma amostra (STAKENBORG et al., 2006b), bem como ensaios de PCR em tempo real utilizados para a detecção (TAKEUTI et al., 2017) e quantificação (MAROIS et al., 2010) do *M. hyopneumoniae* em diferentes amostras.

Quanto ao tipo de amostra utilizada para detecção do agente, as coletadas de tecidos do trato respiratório inferior, como brônquios e bronquíolos, apresentam ter sensibilidade mais alta quando comparadas às amostras obtidas do trato respiratório superior (FABLET et al., 2010). Amostras de fluídos orais apresentaram falta de compatibilidade na detecção de *M. hyopneumoniae*, mesmo depois de longos períodos pós-infecção (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2017). Uma amostra ideal *in vivo* para diagnóstico deve ser oriunda dos bronquíolos e de fácil obtenção (MAES et al., 2017).

3.7 Controle e prevenção

A infecção causada por *M. hyopneumoniae* pode ser controlada por uma combinação de diversos fatores como a otimização de práticas de manejo, biossegurança, condições de alojamento, uso de antibióticos e vacinação. A adoção do sistema de produção “*all-in, all-out*” é de grande importância para o controle da PES visto que pode interromper o ciclo de transmissão do patógeno de suínos adultos para suínos jovens. Outras medidas como evitar a compra de animais de fontes desconhecidas, redução da densidade de animais durante os diferentes estágios de produção, tamanho do rebanho, prevenção de outras doenças e medidas de higiene podem reduzir os riscos da PES (MAES et al., 2008; NATHUES et al., 2012).

Uma vez que o *M. hyopneumoniae* não apresenta parede celular, esse organismo é resistente a antibióticos da classe dos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, bem como antibióticos que tem a parede celular como alvo de

atuação (DEL POZO SACRISTÁN, 2014). Os antimicrobianos potencialmente ativos contra o *M. hyopneumoniae* incluem as tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, florfenicol, aminoglicosídeos, aminociclóis e fluoroquinolonas (VICCA, 2005). Para controle e tratamento de doenças respiratórias como a PES, tetraciclina, sulfonamidas e macrolídeos são os mais utilizados (DEL POZO SACRISTÁN, 2014).

A vantagem do uso de estratégias de prevenção com antimicrobianos é que os mesmos geralmente são eficazes contra uma série de patógenos do trato respiratório e exigem menos mão-de-obra intensiva, visto que o tratamento de grupos se dá através da alimentação ou água (VICCA, 2005). Porém, devido à localização do microrganismo na superfície do trato respiratório, apenas antimicrobianos capazes de atingirem altas concentrações no muco e nos fluidos respiratórios conseguiriam ser eficazes *in vivo*. Além disso, essa estratégia deve ser minimizada a fim de evitar o desenvolvimento de bactérias resistentes (SIMIONATTO et al., 2013).

A vacinação é mundialmente aplicada para o controle de infecções por *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2017). As vacinas comerciais consistem de preparações de células inteiras inativadas associadas a adjuvantes, as bacterinas. A aplicação é realizada em mais de 70% de rebanhos suínos em uma série de países (MAES et al., 2008). As maiores vantagens da vacinação incluem a melhora do ganho de peso diário (2-8%), redução de sinais clínicos e de lesões pulmonares e diminuição dos custos de tratamento (HAESEBROUCK et al., 2004). Entretanto, as bacterinas fornecem somente proteção parcial e não previnem o estabelecimento do *M. hyopneumoniae* nas células epiteliais e o desenvolvimento de lesões pulmonares (HILLEN et al., 2014; THACKER et al., 2000).

Diversos estudos têm avaliado proteínas recombinantes de *M. hyopneumoniae* como vacinas de subunidade ou de DNA em diversas formulações e vias de administração. Algumas foram testadas sozinhas, outras associadas com vetores virais ou bacterianos atenuados, fusionados a adjuvantes de mucosa ou como coquetel de antígenos (SIMIONATTO et al., 2013). A adesina P97 é o antígeno mais estudado e trabalhos com diferentes abordagens já foram descritos (CHEN et al., 2001; CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006; DE OLIVEIRA et al., 2017; KING; JR; ROSEY, 1997; OKAMBA et al., 2010). Outro alvo com potencial vacinal é a proteína de choque térmico P42, que já foi avaliada tanto em camundongos (CHEN et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2017; GALLI et al., 2012;

SIMIONATTO et al., 2012) quanto em suínos (JORGE et al., 2014; MARCHIORO et al., 2014) apresentando-se imunogênica. A maioria destas vacinas apresentaram resultados promissores e podem representar uma ferramenta mais efetiva para o controle da infecção. Porém, a validação em suínos em ensaios experimentais e a campo ainda são necessárias (MAES et al., 2017).

4. Metodologia

4.1 Coleta das amostras

Amostras de pulmão suíno foram coletadas em um frigorífico de inspeção estadual localizado na cidade de Pelotas, o qual recebe animais de granjas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram realizadas quatro coletas em diferentes dias, com 30 pulmões coletados em cada dia, obtendo um total de 120 amostras. Áreas do tecido pulmonar adjacentes às lesões sugestivas (Figura 1A) foram cortadas, devido a essa região apresentar maior probabilidade de isolamento, visto que o microrganismo migra da área com lesão para a não lesionada. Animais que não apresentaram lesões pulmonares (Figura 1B) tiveram as amostras coletadas do lobo apical (área com maior frequência de lesões nos animais infectados). As amostras foram armazenadas a 4 °C até o momento do processamento. No laboratório, as amostras foram seccionadas e uma parte foi estocada em freezer -70 °C para posterior extração de DNA, e a outra parte foi macerada para o isolamento da bactéria. Todo o processamento e a análise das amostras de pulmão foram realizadas no Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

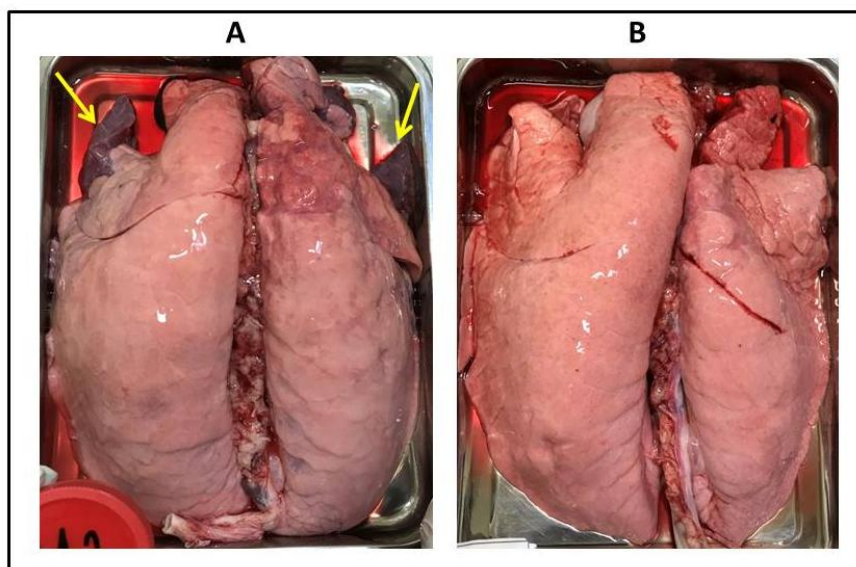


Figura 1. Exemplo de pulmões com (A) e sem lesões sugestivas da PES (B).

4.2 Score de lesões pulmonares

O *score* de lesões pulmonares foi realizado conforme descrito por HANNAN, 1982. Esse método consiste em uma abordagem bi-dimensional utilizando os tamanhos dos lobos pulmonares como parâmetros. A área do pulmão afetada é representada em um diagrama (Figura 2). O número de triângulos afetados por lobo é multiplicado por cinco e dividido pelo número de triângulos em cada lobo pulmonar. O *score* de cada lobo é então somado para proporcionar o *score* geral do pulmão. O *score* é contabilizado por pontos, sendo a pontuação máxima 35 (pulmão inteiro afetado).

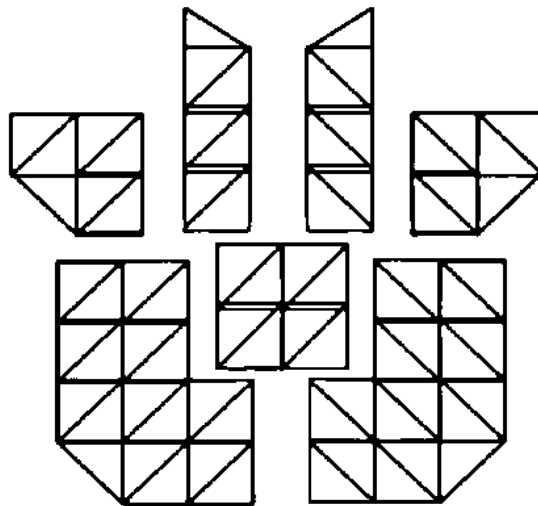


Figura 2. Diagrama pulmonar utilizado no método de *score* de Hannan et al., 1982.

4.3 Cultivo, isolamento e detecção do agente

As amostras de tecido pulmonar adjacentes as lesões (2 cm^3) foram maceradas com 5 ml de meio NHS20 (Meio Friis modificado suplementado com 10% de soro suíno e 10% de soro equino). O sobrenadante das suspensões foi filtrado com membrana de porosidade $0,45 \mu\text{m}$, e alíquotas filtradas e não filtradas foram cultivadas em placas de 96 cavidades em meio de cultivo NHS25 (Meio Friis modificado suplementado com 12,5% de soro suíno e 12,5% de soro equino). Um volume de $20 \mu\text{l}$ dessas alíquotas foi adicionado em $180 \mu\text{l}$ de meio em cada poço seguido de diluições seriadas até 10^{-4} . As placas foram incubadas em estufa à

temperatura 37 °C até a observação do crescimento da bactéria através da acidificação do meio (mudança de coloração do vermelho para alaranjado) por no mínimo 14 dias (padrão de crescimento mais semelhante ao *M. hyopneumoniae*). As amostras foram então repicadas em microtubos contendo 450 µl de meio NHS20 e incubadas novamente em estufa a 37 °C. Nas amostras onde foi possível observar acidificação do meio, 20 µl foram coletados e transferidos para uma placa com meio NHS20 sólido contendo canamicina (2 µg/ml). Estas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C durante sete dias e então observadas em microscópio para seleção das colônias com características morfológicas de *M. hyopneumoniae*. A partir das colônias obtidas em meio sólido foi realizada a clonagem, semeando uma única colônia isolada em meio líquido e novamente em meio sólido. Este procedimento foi realizado três vezes para cada colônia de cada isolado.

Nos cultivos em que foi observado crescimento, o DNA genômico foi extraído com o kit *illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Após a extração, foi realizado um PCR com *primers* específicos para *M. hyopneumoniae* (1000 pb), *M. hyorhinis* (1129 pb) e *M. flocculare* (754 pb) (Tabela 1). As reações foram amplificadas em termociclador nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, anelamento dos *primers* a 54.6 °C por 15 segundos, e extensão a 68 °C por 1 minuto (STAKENBORG et al., 2006b). O produto do PCR dos cultivos foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídio.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados no PCR para detecção do gênero *Mycoplasma*.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
M HYOP FOR	TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC	1000
M HYOR FOR	GGGAAGAAAAAATTAGGTAGGG	1129
M FLOC FOR	CGGGATGTAGCAATACATTAG	754
M VER	AGAGGCATGATGATTTGACGTC	

4.4 Extração de DNA e *Nested-PCR*

O DNA foi extraído das amostras de tecido pulmonar utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega). O DNA extraído (2 µl) foi utilizado para a primeira reação do *Nested-PCR*, a qual foi realizada com *primers* que amplificam uma região de 649 pb do gene do RNA ribossomal 16S (MATTSSON et al., 1995).

Na segunda reação, foram utilizados 0.5 µl do produto da primeira reação com *primers* específicos (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999) que amplificam uma região interna de 352 pb do mesmo gene (Tabela 2). Como controle positivo, foi utilizada a cepa referência de *M. hyopneumoniae* 7448 (VASCONCELOS et al., 2005). Ambas reações foram preparadas para um total de 25 µl e corridas em termociclador com as seguintes condições: 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 60 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos. Alíquotas de 5 µl dos *amplicons* da segunda reação do *Nested-PCR* foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente corado com brometo de etídio. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados no *Nested-PCR*.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Primers</i> externos		
MYHO FOR	GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA	649
MYHO VER	TGTGTTAGTACTTTTGCCACC	
<i>Primers</i> internos		
N-MHYO FOR	ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT	352
N-MHYO VER	GTGGACTACCAGGGTATCT	

4.5 Análise estatística

A associação entre o isolamento, as lesões pulmonares e a prevalência de *M. hyopneumoniae* obtida por *Nested-PCR* foi analisada por Chi-quadrado, utilizando o *software* SPSS v16.0.1 (IBM). O valor de $P < 0,01$ foi definido como estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Score de lesões pulmonares

Das 120 amostras coletadas, 72 (60%) apresentaram *score* positivo, acima de 0 (Tabela 4). A média dos *scores* positivos foi 3,21, sendo o maior *score* observado de 16,93. As amostras com *scores* positivos também foram positivas no *Nested-PCR*, com exceção de uma amostra (A91) (Tabela 3). A detecção de amostras positivas no *Nested-PCR* foi associada com a presença de lesões pulmonares sugestivas de PES ($P < 0,01$). Não houve associação entre o isolamento do microrganismo, a detecção por *Nested-PCR* e lesões pulmonares.

Tabela 3. Panorama geral acerca dos resultados do *score** pulmonar, isolamento e detecção por *Nested-PCR*.

Amostra	Score*	Nested-PCR	<i>M. hyop</i>	<i>M. hyor</i>	<i>M. floc</i>
A1	0	+			
A2	0,26	+			
A3	2,85	+			
A4	2,14	+			
A5	1,42	+			
A6	0	-			
A7	0	-			
A8	0	+			
A9	0	+			
A10	2,86	+			
A11	5	+			
A12	3,57	+			
A13	1,42	+			
A14	5,25	+	+	-	-
A15	0,71	+			
A16	2,85	+			
A17	0	+			
A18	6,41	+			
A19	0	+			
A20	0	+	+	-	-
A21	0	+			
A22	0	+			
A23	0	+			
A24	0	+			
A25	0	+			
A26	0	+			

A27	0	+			
A28	0	+			
A29	0	+			
A30	2,86	+			
A31	0	+			
A32	4,29	+			
A33	0	+			
A34	0	+			
A35	0	+			
A36	1,23	+	-	+	-
A37	1,42	+			
A38	0	+			
A39	0,71	+			
A40	0	+			
A41	0	+			
A42	0	+			
A43	0	+			
A44	0	+			
A45	4,64	+			
A46	2,13	+			
A47	0	+			
A48	0	+			
A49	0	+			
A50	0	+			
A51	0	+			
A52	0,71	+			
A53	0,71	+			
A54	0	+			
A55	0,78	+			
A56	0	+			
A57	0	-			
A58	4,54	+			
A59	1,25	+			
A60	0,71	+			
A61	1,43	+			
A62	1,43	+			
A63	0	+			
A64	2,47	+			
A65	2,86	+			
A66	3,03	+			
A67	2,76	+			
A68	0	+			
A69	1,43	+			
A70	1,68	+			
A71	2,83	+			
A72	4,28	+			

A73	13,45	+
A74	6,5	+
A75	0,71	+
A76	2,83	+
A77	0	+
A78	1,43	+
A79	0,71	+
A80	0	+
A81	1,33	+
A82	9,18	+
A83	5,62	+
A84	1,54	+
A85	3,12	+
A86	2,86	+
A87	3,21	+
A88	0,97	+
A89	6,43	+
A90	3,46	+
A91	1,43	-
A92	0,97	+
A93	16,93	+
A94	2,85	+
A95	10,35	+
A96	2,86	+
A97	0,71	+
A98	3,45	+
A99	3,47	+
A100	0	+
A101	4,73	+
A102	5	+
A103	2,94	+
A104	0	+
A105	0	+
A106	2,14	+
A107	2,85	+
A108	0,71	+
A109	0	+
A110	0	+
A111	2,49	+
A112	10	+
A113	0	+
A114	2,68	+
A115	2,14	+
A116	0	+
A117	3,56	+
A118	0,71	+

A119	0	+
A120	0	+

*scores das lesões determinados segundo Hannan et al. (1982), onde valores variam de 0 (sem lesão) a 35 (pulmão inteiro afetado).

5.2 Cultivo e isolamento

Das 120 amostras que foram cultivadas, três apresentaram acidificação do meio com padrão de crescimento característico de *Mycoplasma*. Destas, duas foram positivas no PCR para *M. hyopneumoniae*. Apenas uma amostra foi positiva para *M. hyorhinis* (Figura 3).

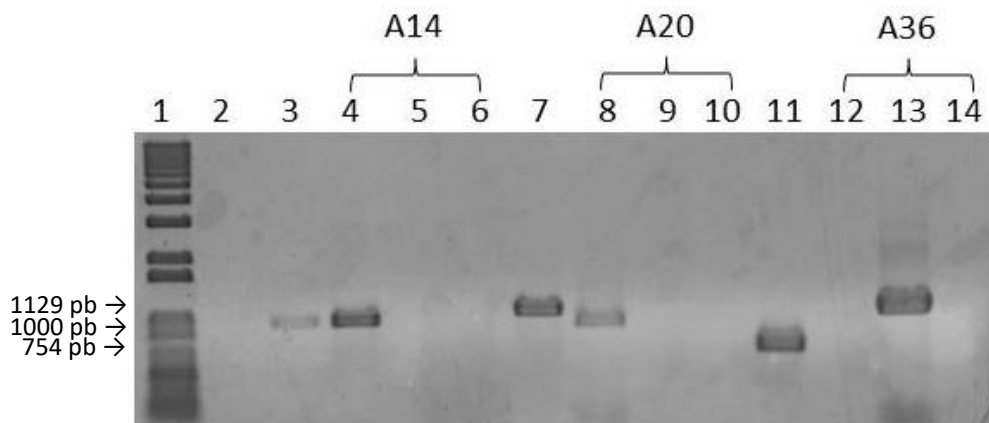


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 0,8% de amostras positivas na PCR para o gênero *Mycoplasma*. 1 - Marcador de peso molecular 1kb; 2 – controle negativo; 3 – controle positivo *M. hyopneumoniae* 7448; 7 – controle positivo *M. hyorhinis*; 11 – controle positivo *M. flocculare*; 4, 8, 12 – amostras com primer para *M. hyopneumoniae*; 5, 9, 13 – amostras com primer para *M. hyorhinis*; 6, 10, 14 – amostras para primer com *M. flocculare*.

5.3 Diagnóstico por *Nested-PCR*

Dentre as 120 amostras coletadas, 115 foram positivas no *Nested-PCR*, demonstrando a presença do microrganismo em 95,83% das amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do *Nested-PCR* e scores pulmonares.

Amostras	<i>Nested-PCR</i> (%)	Incidência de lesões pulmonares (%)	Média do score pulmonar ± SD*
Positivas	115 (95,83)	72 (60)	3,21±2,95
Negativas	5 (4,17)	48 (40)	-
Total	120 (100)	120 (100)	

*Média + Desvio Padrão (SD) dos scores das lesões determinados conforme Hannan et al. (1982), onde os valores variam de 0 (sem lesão) a 35 (pulmão inteiro afetado).

Todas as amostras positivas apresentaram amplificação visível em gel de agarose na segunda reação, cujo *amplicon* corresponde a um fragmento de 352 pb (Figuras 4 a 7).

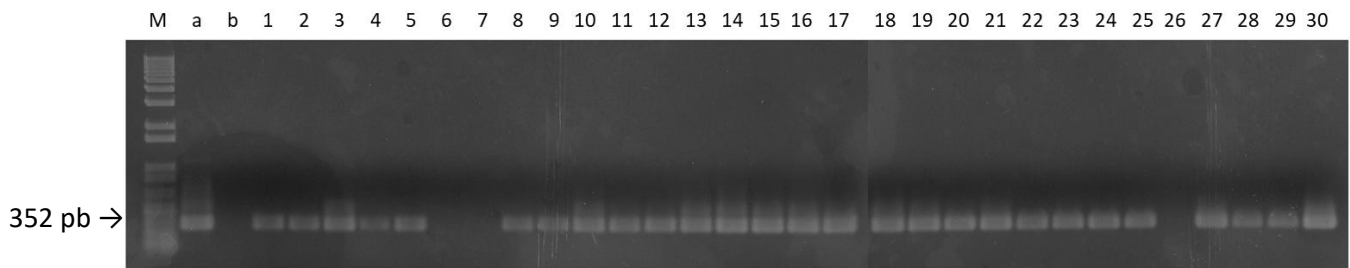


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder); (a) controle positivo (DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448); (b) controle negativo (água estéril); 1 – 30 amostras de tecido pulmonar coletadas em frigorífico.

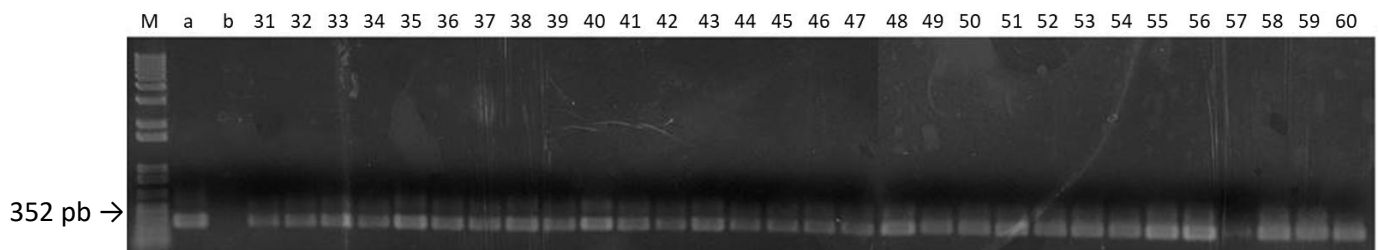


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder); (a) controle positivo (DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448); (b) controle negativo (água estéril); 31 – 60 amostras de tecido pulmonar coletadas em frigorífico.

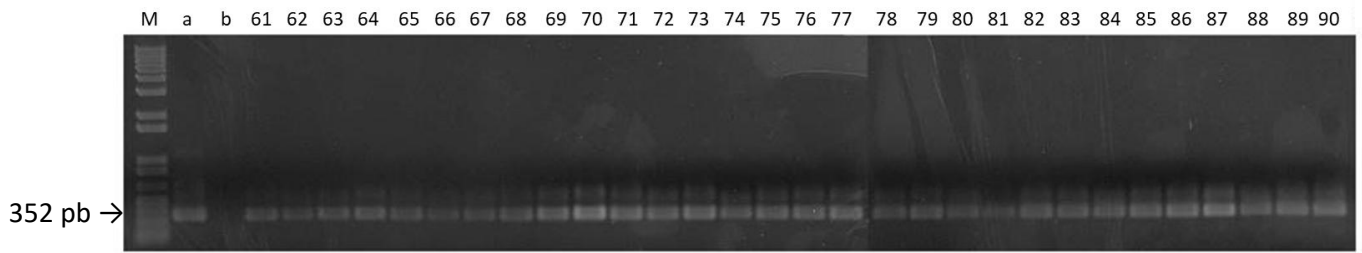


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder); (a) controle positivo (DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448); (b) controle negativo (água estéril); 61 – 90 amostras de tecido pulmonar coletadas em frigorífico.

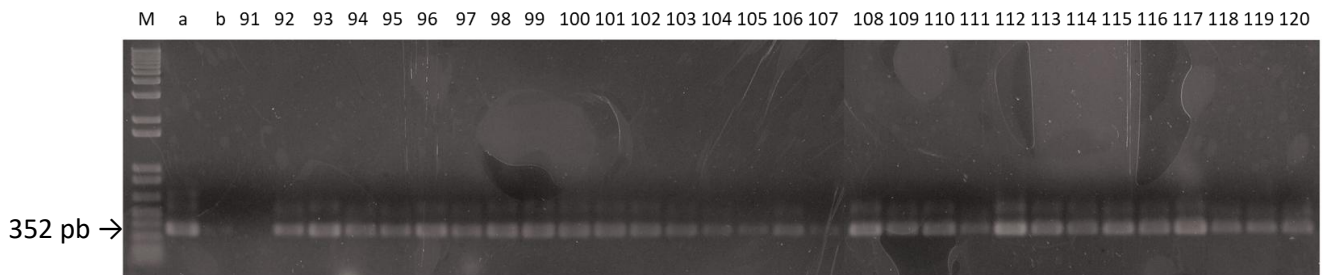


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador de massa molecular (1 kb plus DNA ladder); (a) controle positivo (DNA genômico de *M. hyopneumoniae* cepa 7448); (b) controle negativo (água estéril); 91 – 120 amostras de tecido pulmonar coletadas em frigorífico.

6. Discussão

O *M. hyopneumoniae* é o agente etiológico da PES, e uma das principais bactérias associadas ao PRDC, os quais geram significativas perdas econômicas para o setor de produção suinícola. No presente estudo, amostras de tecido pulmonar provenientes de diferentes rebanhos da região sul do país foram processadas para realizar o isolamento e determinar a prevalência do *M. hyopneumoniae*. Das 120 amostras de pulmão coletadas em abatedouro somente três apresentaram acidificação do meio com padrão característico do gênero *Mycoplasma*. Destas, duas (1,6%) foram confirmadas como isolados positivos para *M. hyopneumoniae*. A baixa taxa de sucesso do isolamento pode ser explicada pela sobreposição de crescimento de outros micoplasmas presentes nas amostras de tecido pulmonar durante as etapas iniciais do cultivo, além da característica naturalmente fastidiosa do patógeno (que pode levar até 40 dias para crescer). Além destes limitantes, outros autores também reportaram a necessidade de um meio enriquecido como os principais fatores que dificultam o isolamento deste agente (CHARLEBOIS et al., 2014; GOMES, 2014; VRANCKX et al., 2011; YAMAGUTI, 2009).

Modificações nos meios de cultivo como adição de antibióticos, suplementação com nutrientes e outros aditivos vem sendo reportados na tentativa de obter maior sucesso no crescimento *in vitro* desse microrganismo (YAMAGUTI, 2009). Recentemente, Cook e colaboradores (2016) modificaram o meio Friis (1975) sólido. A adição de ágar purificado e DEAE-Dextran (derivado do polímero dextrana) aumentou o crescimento das colônias de *M. hyopneumoniae*. Além disso, a incorporação do antibiótico canamicina na concentração 2 µg/ml permitiu a supressão do crescimento de *M. hyorhinis*. Estas modificações no meio de cultivo foram utilizadas neste trabalho, e a adição do antibiótico canamicina parece ter inibido eficientemente o crescimento de *M. hyorhinis*, uma vez que não foi observada a formação de colônias características deste microrganismo.

A detecção por *Nested-PCR* através de amostras de tecido pulmonar apresentou 95,83% das amostras positivas para *M. hyopneumoniae*, demonstrando uma alta prevalência da PES em granjas do Rio Grande do Sul. O uso do *Nested-PCR* para diagnóstico da PES a partir de *swab* nasal tem sido amplamente utilizado

e considerado um método eficaz para o monitoramento da infecção a nível de rebanho ou individual (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999; SIBILA et al., 2009; YAMAGUTI; MULLER; PIFFER, 2008). Makhanon e colaboradores (2012) obtiveram prevalência de 77,4% em amostras de tecido pulmonar de suínos abatidos utilizando PCR. Segundo os autores, esse tipo de amostras são as mais confiáveis para o diagnóstico molecular de suínos abatidos convalescentes e carreadores do patógeno. Neste trabalho, a utilização do *Nested-PCR* em amostras *post-mortem*, mostrou-se altamente sensível na detecção do *M. hyopneumoniae* reforçando também sua aplicabilidade para avaliar a prevalência do agente.

Na análise do *score* pulmonar, 60% das amostras apresentaram lesões sugestivas de PES. Destas, apenas uma não foi positiva para o patógeno no *Nested-PCR*. Uma vez que as lesões causadas por *M. hyopneumoniae* não são patognomônicas, o *score* positivo gerado para esta amostra pode ser devido a lesões causadas por outros patógenos. Por outro lado, algumas amostras foram positivas no *Nested-PCR*, mas não apresentaram *score* para lesão. Este resultado pode ser devido ao processo de cicatrização natural das lesões, onde o microrganismo permanece no trato respiratório, tornando os animais carreadores assintomáticos (SIQUEIRA et al., 2017). Nestes casos, a utilização de métodos moleculares como o *Nested-PCR* torna-se uma ferramenta útil pois é capaz de detectar pequenas quantidades de microrganismos por amostra (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999), os quais poderiam ser considerados falso-negativos por outros métodos menos sensíveis.

Na maioria das amostras não foi possível realizar o cultivo do *M. hyopneumoniae*, mesmo estas apresentando um diagnóstico positivo por PCR e *score* de lesão pulmonar indicativo da doença. O resultado positivo no PCR confirma a infecção e a presença da bactéria no animal, porém não é suficiente para garantir o sucesso no cultivo dessa bactéria de natureza fastidiosa (MAKHANON et al., 2012).

A elevada prevalência de *M. hyopneumoniae* nos rebanhos suínos de abate vem sendo reportada, chegando até 93,6% (FABLET et al., 2012; GROSSE BEILAGE; ROHDE; KRIETER, 2009; MAKHANON et al., 2012; SIBILA et al., 2007). A presença desse agente pode ser influenciada pelas condições de manejo e alojamento dos animais, principalmente quando provenientes de regiões próximas devido à transmissão do patógeno pela via aérea (MAES et al., 2008). No Brasil, há

poucos dados disponíveis sobre a prevalência da infecção. Conforme Vicente e colaboradores (2013), 52% das amostras coletadas de diferentes granjas da região central do estado de São Paulo foram soropositivas para o *M. hyopneumoniae*. Silva e colaboradores (2009) também detectaram este agente em 52,6% das amostras de pulmão suíno na região Sudeste do Brasil. Dados específicos da prevalência de cada país são limitados, devido ao fato da doença não ser considerada de notificação obrigatória e não ser limitante para as trocas comerciais (MAES et al., 2017).

Um estudo demonstrou que a severidade das lesões no abate são significativamente mais altas onde diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* foram encontradas, indicando pela primeira vez a importância da diversidade genética a nível de lotes em rebanho (MICHIELS et al., 2017). No presente trabalho, a prevalência de *M. hyopneumoniae* foi determinada em amostras de tecidos pulmonar oriundas de diferentes regiões do sul do Estado. A detecção do patógeno associada à identificação de lesões pulmonares sugestivas da PES indica a presença de cepas infectantes e virulentas circulantes nestes rebanhos. Foi possível realizar o isolamento de algumas destas cepas, no entanto devido à característica fastidiosa de seu crescimento não houve tempo hábil para realizar a caracterização genética e sequenciamento. Do ponto de vista epidemiológico, a caracterização de isolados de *M. hyopneumoniae* pode facilitar a compreensão de sua transmissão e das características das cepas infectantes dentro do mesmo rebanho e entre rebanhos diferentes. A compreensão das variações de padrão de infecção entre cepas individuais de *M. hyopneumoniae* é importante para a implementação de melhores medidas de controle (VILLARREAL et al., 2011). Por fim, o isolamento, para posterior caracterização de cepas infectantes encontradas em suínos oriundos de diferentes regiões do estado, pode vir a contribuir no desenvolvimento de formulações vacinais contendo cepas locais, que podem ser mais efetivas para o controle da doença.

7. Conclusão

- Foram obtidos dois isolados puros de *M. hyopneumoniae*;
- O *Nested-PCR* foi eficiente na detecção do *M. hyopneumoniae*;
- A presença de lesões pulmonares sugestivas de PES associadas à detecção molecular indica a elevada prevalência do agente causador da doença (95,83%) nos rebanhos suínos do sul do país;
- Na continuidade do estudo, serão realizados o sequenciamento e a caracterização das cepas isoladas.

8. Referências

- ADAMS, C.; PITZER, J.; MINION, F. C. In Vivo Expression Analysis of the P97 and P102 Paralog Families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 73, n. 11, p. 7784–7787, 2005.
- ARTIUSHIN, S.; MINION, F. C. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 324–328, 1996.
- BIN, L. et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e101968, 2014.
- BURCH, D. G. S. The comparative efficacy of antimicrobials for the prevention and treatment of Enzootic Pneumonia and some of their pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. **The Pig Journal**, v. 53, p. 8–27, 2004.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 251, n. 1999, p. 246–251, 1999.
- CALUS, D. et al. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 3–4, p. 284–291, 2007.
- CHARLEBOIS, A. et al. Genetic diversity of mycoplasma hyopneumoniae isolates of abattoir pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2–4, p. 348–356, 2014.
- CHEN, J. R. et al. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: In vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 347–357, 2001.
- CHEN, Y. L. et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1155–1160, 2003.
- CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. **The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne**, v. 44, n. 9, p. 735–737, 2003.
- CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196–203, 2013.
- CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 1034–1042, 2006.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, Â. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, n. 29–30, p. 5734–5743, 2006.

COOK, B. S. et al. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 158–164, 2016.

DE OLIVEIRA, N. R. et al. A novel chimeric protein composed of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens as a vaccine candidate evaluated in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 146–153, 2017.

DEBEY, M. C.; ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5312–5318, 1994.

DEL POZO SACRISTÁN, R. **Treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections**. 2014. 189f. Tese (PhD em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Ghent, Merelbeke, 2014. Disponível em <<https://biblio.ugent.be/publication/5335391>> Acesso em: 17 ago. 2017.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 25–57, 1996.

FABLET, C. et al. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2–4, p. 238–245, 2010.

FABLET, C. et al. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 152–163, 2012.

FREY, J.; HALDIMANN, A.; NICOLET, J. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. **International journal of systematic bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 275–80, 1992.

GALLI, V. et al. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 135–140, 2012.

GARCIA-MORANTE, B. et al. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: A Comparative Review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 154, n. 2–3, p. 125–134, 2016.

GOMES, C. K. **Pneumonia Enzoótica Suína: Isolamento do agente e expressão de antígeno recombinante em *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestre em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014. Disponível em: <https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=150016> Acesso em: 17 ago. 2017.

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, n. 4, p. 255–263, 2009.

HAESEBROUCK, F. et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3–4, p. 255–268, 2004.

HAN, J. et al. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain KM014, a Clinical Isolate from South Korea. **Genome Announcements**, v. 5, n. 38, p. 4–5, 2017.

HANNAN, P.C., BHOGAL, B.S. & FISH, J. P. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. **Research in veterinary science**, v. 33, n. 1, p. 76–88, 1982.

HERNANDEZ-GARCIA, J. et al. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. **Porcine Health Management**, v. 3, n. 1, p. 7, 2017.

HILLEN, S. et al. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 4, p. 580–588, 2014.

JOHANSSON, K.; PETTERSSON, B. Taxonomy of Mollicutes. In: RAZIN; HERRMANN (Eds.). . **Molecular Biology and Pathogenicity Of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2002. p. 29.

JORGE, S. et al. The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 229–236, 2014.

KAMMINGA, T. et al. Metabolic modeling of energy balances in *Mycoplasma hyopneumoniae* shows that pyruvate addition increases growth rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2339–2347, 2017.

KING, W.; JR, J. Y.; ROSEY, L. Characterization of the gene encoding Mhpl from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. **Vaccine**, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1997.

KOKOTOVIC, B. et al. Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of *Mycoplasma* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3300–3307, 1999.

LIU, W. et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 4, p. 1016–1017, 2011.

LIU, W. et al. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 80, 2013.

MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297–309, jan. 2008.

MAES, D. et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs:

Knowledge gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. March, p. 1–15, 2017.

MAKHANON, M. et al. Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, and *Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 2, p. 313–318, 2012.

MARCHIORO, S. B. et al. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTB. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1–2, p. 166–171, 2014.

MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 96–104, 2007.

MAROIS, C. et al. 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, n. 5, p. 1523–1533, 2010.

MATTSSON, J. G. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 893–897, 1995.

MEYNS, T. et al. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 388–392, 2011.

MICHIELS, A. et al. Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 2, 2017.

MINION, F. C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7123–7133, 2004.

MINION, F. C.; ADAMS, C.; HSU, T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3056–3060, 2000.

NATHUES, H. et al. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 338–345, 2011.

NATHUES, H. et al. Herd-Level risk factors for the seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the occurrence of enzootic pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 4, p. 316–328, 2012.

NATHUES, H. et al. Estimating the within-herd transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in closed pig herds using a stochastic compartment model. **Journal of Porcine Health Management**, p. 1–14, 2016.

NETO, J. C. G. et al. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. **Veterinary Microbiology**, v. 174, n. 1–2, p. 163–171, 2014.

OKAMBA, F. R. et al. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine**, v. 28, n. 30, p. 4802–4809, 2010.

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, n. 3–4, p. 198–208, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 4, p. 1094–156, 1998.

RODRÍGUEZ, F. et al. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 4, p. 306–312, 2004.

SEYMOUR, L. M. et al. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33971–33978, 2010.

SIBILA, M. et al. 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. et al. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 165–170, 2008.

SIBILA, M. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 221–231, 2009.

SILVA, F. M. F. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. February, p. 149–155, 2009.

SIMIONATTO, S. et al. Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 2, p. 209–216, 2012.

SIMIONATTO, S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3–4, p. 234–242, 2013.

SIQUEIRA, F. M. et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC genomics**, v. 14, p. 175, 2013.

SIQUEIRA, F. M. et al. Microbiome overview in swine lungs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7,

p. 1–12, 2017.

SOBESTIANSKY, J. Pneumonia Enzoótica. **Clínica e patologia suína**, v. 2, p. 359, 1999.

STAKENBORG, T. et al. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 29–36, 2005.

STAKENBORG, T. et al. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 263–275, 2006a.

STAKENBORG, T. et al. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 3, p. 239–247, 2006b.

STÄRK, K. D. C. et al. A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 26, n. April, p. 595–606, 2007.

TAKEUTI, K. L. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. **Veterinary Microbiology**, v. 203, n. February, p. 215–220, 2017.

THACKER, E. L. et al. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **Veterinary Medical Research Institute**, v. 61, n. 11, p. 1384–1389, 2000.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 5, n. 2, p. 317–320, 2004.

THACKER, E. L.; MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. J; KARRIKER, L. A; RAMIREZ, A; SCHWARZ, K. J; STEVENSON, G. W. (Ed.). **Diseases of Swine**. 10.ed. Ames: John Wiley & Sons, 2012. p. 779–798.

THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; JANKE, B. H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 39, n. 7, p. 2525–2530, 2001.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. Swine and Poultry Pathogens: the Complete Genome Sequences of Two Strains of. **Microbiology**, v. 187, n. 16, p. 5568–5577, 2005.

VICCA, J. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 3–4, p. 177–190, 2003.

VICCA, J. **Virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs**. Tese (PhD em Ciência Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Ghent, Merelbeke, 2005. Disponível em <http://www.rohh.ugent.be/v3/research/phd/2005/Vicca_J.pdf> Acesso em: 17 ago. 2017.

VICENTE, A. F. et al. Soropositividade para *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos abatidos em frigoríficos da região central do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1899–1903, 2013.

VILLARREAL, I. et al. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1731–1735, 2011.

VRANCKX, K. et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 2020–2023, 2011.

VRANCKX, K. et al. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3–4, p. 315–321, 2012.

WALKER, R. L. Mollicutes. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. . (Eds.). . **Veterinary Microbiology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 155–162.

YAMAGUTI, M. **Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA**. 145f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde.../MauricioYamaguti_Doutorado.pdf> Acesso em: 17 ago. 2017.

YAMAGUTI, M.; MULLER, E. E. E.; PIFFER, A. A. I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 471–476, 2008.

ZHANG, Q. et al. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. **Infection and immunity**, v. 63, n. 3, p. 1013–1019, 1995.