

RAQUEL VITARELLI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SOROLÓGICA DE
SUÍNOS SPF INOCULADOS COM
Mycoplasma hyopneumoniae.**

Dissertação apresentada à Uni-
versidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção de grau de Mestre
em Medicina Veterinária, área de
concentração Medicina Vete-
rinária Preventiva.

Orientador: Prof. Ronaldo Reis.

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1993

V837a Vitarelli, Raquel, 1966 -
Avaliação da resposta sorológica
de suínos SPF inoculados com Mycoplasma
hyopneumoniae/Raquel Vitarelli. -
Belo Horizonte: UFMG - Escola de Vete-
rinária, 1994.
60p. : il.
Dissertação (Mestrado)
1- Suíno - Doenças - Diagnóstico -
Teses. 2. Soro diagnóstico -
Teses. I. Título.
CDD.636.408.969 2

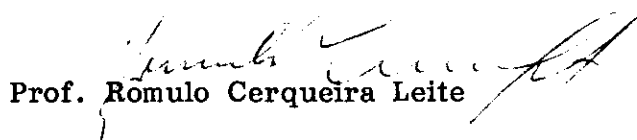
Dissertação defendida e aprovada em 28/03/94, pela
Comissão Examinadora constituída por:



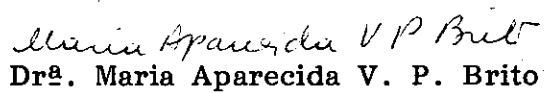
Prof. Ronaldo Reis
Orientador



Prof. Ernane Egundes do Nascimento



Prof. Romulo Cerqueira Leite



Dr^a. Maria Aparecida V. P. Brito



Dr. Jose Renaldi F. Brito

Aos meus pais,

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ronaldo Reis pelos ensinamentos, competência, indispensável orientação e atenção.

Ao Dr. Itamar A. Piffer pela orientação e por tornar possível a realização da parte experimental do trabalho.

Aos Profs. Ernane F. do Nascimento, Rômulo C. Leite e demais professores da Escola de Veterinária da UFMG, pela contribuição importante na minha formação profissional.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho e, acima de tudo, obrigada pelo carinho e amizade de todos. Em especial agradeço aos pesquisadores e funcionários de Setor de Sanidade Animal do CNPSA, pela colaboração e dedicação, bem como os momentos agradáveis e inesquecíveis que me proporcionaram.

Ao Chico agradeço todo amor, carinho, apoio, compreensão e o imenso prazer da sua companhia.

A veterinária Thais R.C. Dittrich pela orientação com o KELA.

À funcionária Marri Fracasso pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

À bióloga Ivane Müller, funcionária do CNPSA, pelo auxílio na parte experimental do trabalho, pelo carinho, companhia, hospitalidade e, principalmente, pela enorme amizade.

Aos grandes amigos Francisco Thaisen e Eunice Gemelli, pela inestimável companhia, amizade, incentivo e compreensão que sempre me presentaram.

Aos amigos Marcelo T. Paniago, Adriana A. Mello e Terezinha Assumpção pela inestimável amizade e ajuda.

Aos colegas do curso de pós-graduação e aos amigos de Concórdia pelo calor humano recebido.

Ao Alan Delon (meu cão) pelo amor, carinho e fidelidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. REPRODUÇÃO DA PNEUMONIA MICOPLÁSMICA EM SUÍNOS SPF	23
3.1.1. Produção de soro imune	23
3.1.2. Inoculação dos suínos	23
3.1.3. Necrópsia	25
3.1.5. Exame histopatológico	26
3.1.4. Isolamento do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	26
3.1.6. Teste de imunofluorescência	26
3.1.7. Testes bacteriológicos	27
3.2. AVALIAÇÃO DE UM "KIT" COMERCIAL DE DIAGNÓSTICO DA PNEUMONIA MICOPLÁSMICA SUÍNA	27
3.3. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PARA O TESTE DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO	28
3.4. PRODUÇÃO DE ANTÍGENO PARA O TESTE IMUNOENZIMÁTICO	29

3.5. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO	30
3.6. PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO	32
4. RESULTADOS	35
4.1. REPRODUÇÃO DA PNEUMONIA MICOPLÁSMICA EM SUÍNOS SPF	35
4.1.1. Exame clínico e anátomo-histopatológico	35
4.1.2. Isolamento do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	36
4.1.3. Testes bacteriológicos	37
4.2. AVALIAÇÃO DE UM "KIT" COMERCIAL DE DIAGNÓSTICO DA PNEUMONIA MICOPLÁSMICA SUÍNA	37
4.3. PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO	42
4.4. PADRONIZAÇÃO DO TESTE IMUNOENZIMÁTICO	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	51
7. SUMMARY	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 01 Identificação dos suínos SPF empregados no experimento	24
QUADRO 02 Distribuição dos reagentes para a produção do padrão de hemólise	31
QUADRO 03 Concentração inicial de cada partida de antígeno nas seis provas realizadas	33
QUADRO 04 Isolamento de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e presença de lesões morfológicas compatíveis com a PMS nos animais do grupo A	37
QUADRO 05 Resultados do teste imunoenzimático ("kit" Bommeli), feito com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo A inoculados com (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>)	38
QUADRO 06 Resultados do teste imunoenzimático ("kit" Bommeli), feito com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo B inoculados com (<i>Mycoplasma flocculare</i>)	39
QUADRO 07 Resultados do teste com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo C (controle negativo)	40
QUADRO 08 Quadro de contigência para a associação do "status" da PMS com o "status" frente ao teste imunoenzimático	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01	Distribuição dos reagentes na microplaca para a padronização das partidas de antígeno produzidas para o teste de fixação de complemento 31
FIGURA 02	Disposição das diluições da solução de antígeno na microplaca 33
FIGURA 03	Disposição, na microplaca, das amostras de soro testadas, identificadas com o número do animal 34
FIGURA 04	Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo A 38
FIGURA 05	Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo B 39
FIGURA 06	Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo C 40
FIGURA 07	Esquema gráfico das médias das absorvâncias de cada grupo 42
FIGURA 08	Resultado da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 1 43
FIGURA 09	Resultado da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 1 43

FIGURA 10	Resultado da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 2	43
FIGURA 11	Resultado da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 2	44
FIGURA 12	Resultado da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 3	44
FIGURA 13	Resultado da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 3	44
FIGURA 14	Médias das absorvâncias lidas nas seis provas executadas para testar a partida 4 de antígeno para o teste imunoenzimático	45
FIGURA 15	Médias das absorvâncias lidas nas seis provas executadas para testar a partida 5 de antígeno para o teste imunoenzimático	46

RESUMO

Vinte e quatro suínos SPF foram divididos em 3 grupos de oito animais cada (A, B e C). Três animais do grupo A foram inoculados por via intra-traqueal com *Mycoplasma hyopneumoniae* e os cinco suínos restantes mantidos em contato com os inoculados. Da mesma forma, 3 suínos do grupo B foram inoculados por via intra-nasal com *Mycoplasma flocculare* e os demais deixados em contato com os mesmos. Oito animais foram mantidos como controle. Foram obtidas, semanalmente, amostras de sangue de cada animal. Os soros foram usados como soro padrão positivo para *M. hyopneumoniae*, soro padrão positivo para *M. flocculare* e soro padrão negativo, para avaliar um "kit" comercial importado¹ de diagnóstico sorológico da Pneumonia Micoplásmica Suína (PMS), 3 partidas experimentais de antígeno para o teste de fixação de complemento e duas partidas de antígeno para o teste imunoenzimático para o diagnóstico da PMS. Concluiu-se que o "kit" avaliado apresentou baixa sensibilidade para detectar anticorpos contra o *M. hyopneumoniae*, podendo induzir a resultados falso-negativos. Por outro lado, o "kit" demonstrou 100% de especificidade em relação ao *M. flocculare*. Os resultados revelaram que pode-se usar este "kit" para definir o "status" sanitário de um rebanho, porém 31% dos animais com resultado negativo podem estar com a PMS e este fato deve ser levado em consideração na interpretação dos resultados. Os métodos empregados para a produção dos antígenos para os testes de fixação de complemento e imunoenzimático foram ineficientes.

PALAVRAS CHAVES - *Mycoplasma hyopneumoniae*, Pneumonia Micoplásmica Suína, Pneumonia Enzoótica Suína, Enzyme Immunoassay Kit Dr. Bommeli, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e Teste de Fixação de Complemento.

¹Dr. Bommeli AG. 0059/1/89. Stationsstrasse 12, CH - 3097, Liebefeld-Bern. Switzerland.

1. INTRODUÇÃO

O sistema intensivo de produção de suínos é adotado pela grande maioria das suinoculturas industriais. Neste sistema, os suínos são manejados e mantidos em ambiente que favorece o aparecimento ou agravamento de doenças respiratórias, como a pneumonia micoplásmica suína, pleuropneumonia e rinite atrófica.

Particularmente, a Pneumonia Micoplásmica Suína (PMS), também conhecida como pneumonia enzoótica suína, é considerada como o fator que mais interfere na eficiência de produção de suínos (DAYALU e ROSS, 1990; MADSEN, 1982).

Clinicamente, a doença é caracterizada por um curso crônico, tosse, queda da conversão alimentar e retardamento do crescimento. Apresenta alta taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade (KUBO et al., 1990; IBAYASHI et al., 1990; PETERSON et al., 1990).

Segundo POITON et al. (1985), a PMS quando endêmica, provoca uma queda de 13,9% na conversão alimentar, uma redução de 12,7% na taxa de crescimento dos animais infectados experimentalmente e de 15,9% nos animais infectados naturalmente. Estas perdas ocorrem deste o desmame até o abate.

O agente etiológico da PMS é o *Mycoplasma hyopneumoniae*, mas raramente encontra-se, apenas, este microrganismo infectando os pulmões dos animais doentes. Geralmente, a doença é exacerbada por agentes secundários, principalmente *Pasteurella multocida* sorotipo A (BUCH, 1982; KAZAMA et al., 1989).

A PMS tem uma distribuição mundial (KAZAMA et al., 1989; DAYALU e ROSS, 1990), aparecendo de maneira similar em todo o mundo, apesar das diferenças climáticas e de manejo (THOMAS, 1984). A prevalência do *M. hyopneumoniae* em populações suínas comerciais é muito alta (PETERSON et al., 1990), sendo a PMS uma das doenças mais comuns dos suínos (FALK et al., 1990). STIPKOVITS (1990) estima que o *Mycoplasma hyopneumoniae* se encontra presente em 80% das granjas comerciais de suínos em todo o mundo.

Considera-se que a PMS ocorra de forma bastante disseminada no Brasil, representando um problema para os

produtores devido aos prejuízos econômicos gerados por esta doença. O problema é agravado pelo difícil controle da PMS, pois o *M. hyopneumoniae* é muito resistente e/ou insensível a antibióticos e drogas de um modo geral.

Outro fator agravante é o baixo número de pesquisas que estão sendo realizadas no sentido de diagnosticar e controlar a PMS no Brasil. Ainda não foram desenvolvidas no país técnicas laboratoriais eficientes de diagnóstico desta doença, impossibilitando a execução de programas de controle e avaliações das vacinas comerciais. No entanto, é possível a importação de "kits" de diagnóstico sorológico da PMS, porém estes apresentam alto custo.

Pretende-se com este trabalho contribuir com a instituição de métodos laboratoriais de diagnóstico da PMS, que sejam seguros, precisos, sensíveis, específicos e economicamente viáveis.

Foi avaliado um "kit" comercial importado e foram testados métodos de produção de antígenos de *M. hyopneumoniae* para serem empregados nos testes de fixação de complemento e imunoenzimático, este baseado na cinética da reação. Para tal, foi feito a reprodução da PMS em suínos SPF, visando a produção de soro imune a ser empregado como soro padrão positivo nos testes sorológicos e na avaliação do "kit" comercial. Inoculou-se, também, suínos SPF com *Mycoplasma flocculare*, objetivando a produção de soro imune contra esse microrganismo, o qual foi usado para testar a especificidade do "kit" comercial avaliado e dos antígenos produzidos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Atualmente no Brasil, o diagnóstico da PMS é feito através da observação da sintomatologia clínica e observação de lesões macroscópicas e microscópicas típicas. Porém, estas lesões não são patognomônicas. Segundo STIPKOVITS (1990), a ausência de lesões em pulmões não indica ausência de infecção e, por outro lado, a presença de lesões histopatologicamente sugestivas de PMS, não é específica da doença.

Métodos confiáveis de diagnóstico são essenciais para o sucesso de programas de controle da PMS (FREEMAN et al., 1984; ARMSTRONG et al., 1984), sendo importante não só onde a doença é endêmica, mas principalmente para monitoramento de rebanhos livres da doença. Nestes rebanhos, devido a estrutura do sistema de comercialização de animais de reprodução, assume fundamental importância o diagnóstico preciso para que não haja, através da movimentação dos suínos, a infecção de rebanhos indenes e, também, para que o efeito deletério da PMS não interfira no processo de seleção dos animais.

É citado na literatura estrangeira vários métodos laboratoriais de diagnóstico da PMS, os quais estão descritos a seguir, juntamente com suas vantagens e limitações.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO - O *M. hyopneumoniae* é um microrganismo muito difícil de ser cultivado "in vitro", devido ao seu crescimento lento e às exigências, quanto ao meio de cultura. Este fato limita o uso desta técnica para o diagnóstico em rotina da PMS, principalmente devido às dificuldades e variações do método de isolamento (McKEAN et al., 1979; AMANFU et al., 1984).

IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA - Este é um método eficiente para a detecção do *M. hyopneumoniae* em secções de pulmões. Segundo WENG (1980), este teste apresenta boa especificidade, sensibilidade, rapidez e precisão. Porém apresenta algumas limitações que impedem o uso em rotina, como: necessidade de manter a amostra a ser testada em gelo seco, logo após a colheita; seu uso é limitado ao diagnóstico de animais que se encontram na fase inicial da PMS, pois o *M. hyopneumoniae* só está presente nesta fase, e, por fim, o teste é feito em amostras de

pulmões de animais abatidos, o que impossibilita a discriminação de animais vivos livres e contaminados pelo agente etiológico da doença. Esta discriminação é de grande valor em animais que serão comercializados.

TESTES SOROLÓGICOS - Os testes sorológicos são importantes ferramentas para o diagnóstico de doenças e possuem a vantagem de serem executados em animais vivos. A maioria dos testes sorológicos de diagnóstico da PMS não é considerada completamente satisfatória, devido às reações cruzadas entre o *M. hyopneumoniae* e o *M. flocculare*, que é um habitante comum e apatógeno dos pulmões dos suínos (ARMSTRONG et al., 1987). Estes micoplasmas possuem epitópos semelhantes, o que induz a uma alta porcentagem de resultados falso-positivos (YOUNG e ROSS, 1987; MORI et al., 1988). É necessário utilizar, portanto, métodos sorológicos que minimizam estes falsos resultados.

Inibição da hemaglutinação - Segundo KOBISCH e NICOLET (1987) este é um método com relativa especificidade, porém a sua sensibilidade e precisão é mais baixa do que os testes de fixação de complemento e imunoenzimático para o diagnóstico da PMS. Uma limitação deste teste é o fato de necessitar de hemácias de perus, as quais só são obtidas com facilidade em poucas regiões produtoras de suínos no Brasil.

Aglutinação em látex - McKEAN et al. (1979) concluíram que o teste de aglutinação em látex é um método útil e sensível para a avaliação da infecção pelo *M. hyopneumoniae*, principalmente com a doença em fase mais avançada, porém é questionada a especificidade do mesmo.

Fixação de complemento - O teste de fixação de complemento tem sido amplamente utilizado para o diagnóstico laboratorial da PMS em vários laboratórios especializados nos Estados Unidos e na Europa. Este método é menos sensível que o teste imunoenzimático, principalmente em fases mais avançadas da infecção (LLOYD et al., 1987). No entanto, utilizando o método de diluição do complemento conseguiu-se aumentar a sensibilidade do teste, possibilitando a detecção de anticorpos contra o *M. hyopneumoniae*, principalmente, em estádios iniciais da infecção. Comparando com os demais métodos imunológicos de diagnóstico da PMS, o teste de fixação de complemento apresenta boa especificidade (ROSS, 1986).

"Imunoblotting" - Este é o método mais preciso e específico para o diagnóstico sorológico da PMS, uma vez que é capaz de separar componentes antigênicos específicos do *Mycoplasma hyopneumoniae* (MORI et al., 1988). Porém, sua aplicabilidade está limitada aos laboratórios mais especializados.

Testes imunoenzimáticos - Estes são métodos de alta sensibilidade e têm sido empregados com sucesso para o diagnóstico preciso e específico de diversas doenças. Já existem "kits" comerciais importados que utilizam teste imunoenzimático para o diagnóstico da PMS.

O mais usado dos testes imunoenzimático é o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), pois apresenta baixo custo, quando comparado com outros métodos de diagnóstico, fácil execução e proporciona a obtenção dos resultados com rapidez. No entanto, tem se questionado a especificidade do ELISA para o diagnóstico da PMS, devido à possível reação cruzada com outros micoplasmas, especialmente *Mycoplasma flocculare*. Segundo FREEMAN et al. (1984), o grau de reação cruzada entre *M. hyopneumoniae* e outros micoplasmas suínos é significativo, acarretando resultados falso-positivos no ELISA. Porém, estudos mais recentes contradizem esta hipótese. KAZAMA et al. (1989) utilizou o "tween20" para a extração do antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* e não observou reação cruzada com soro hiperimune de *M. flocculare*, aumentando-se assim a especificidade do teste. Segundo ARMSTRONG et al. (1987), os suínos infectados naturalmente pelo *M. flocculare* não desenvolvem níveis de anticorpos suficientes para interferir com o teste. Estes fatos sugerem que o ELISA pode ser um método eficiente para o diagnóstico da PMS.

Existem várias técnicas para a execução e a padronização de testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos. O sistema KELA (Kinectics Based Enzyme Linked Immunosorbent Assay), desenvolvido por JACOBSON e DOWNING (1991), é um teste computadorizado baseado na cinética da catalização do substrato. Segundo JACOBSON et al. (1982), quando comparado aos testes sorológicos convencionais, o KELA demonstra maior eficiência através da automatização e computadorização. Este sistema reduz consideravelmente as variações relacionadas com a instrumentação, reagentes e operador, obtendo-se assim resultados

mais específicos e precisos. No sistema KELA são empregados soros padrões positivos com baixo, moderado e alto título de anticorpos, para a padronização de uma curva das densidades óticas. Estas características do KELA podem ser adequadas para distinguir a resposta sorológica induzida pelo *M. hyopneumoniae* daquela induzida pelo *M. flocculare*, aumentando a especificidade do teste, visto que os animais infectados pelo *M. flocculare* apresentam título de anticorpos significativamente menores (ARMSTRONG, 1987).

É possível hoje no país, a importação de "kits" de diagnóstico da PMS que empregam testes imunoenzimáticos como o ELISA indireto, no entanto não conhecemos a eficiência dos mesmos. O presente trabalho visa a avaliação de um "kit" comercial importado. Com esta dissertação pretende-se, também dar o primeiro passo no sentido de desenvolver técnicas laboratoriais de diagnóstico da PMS no Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reprodução da Pneumonia Micoplásmica em Suínos SPF

3.1.1. Preparação do inóculo

Para a preparação dos inóculos, as seguintes amostras de micoplasmas foram empregadas:

- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- Purdue - Master Seed. 11 passagens. 10/10/89;
- *Mycoplasma flocculare*:
- ATCC 27395. Aug/8/72. MED555.

Estas amostras foram cultivadas em meio de Friis (FRIIS, 1975) sem a adição de antibióticos, incubadas a 37°C, sob agitação até o meio atingir o pH 6,8. Neste ponto, considerou-se que o inóculo estava com número suficiente de microrganismos para infectar os animais (HODGES e BETTS, 1969).

Foram colhidas amostras de cada inóculo para determinar a concentração de organismos viáveis através da Unidade de Mudança de Cor (UMC), segundo TAJIMA e YAGIHASHE (1982). Os inóculos de *M. hyopneumoniae* apresentaram uma UMC média de $10^{6.5}$ e os de *M. flocculare* $10^{4.5}$.

3.1.2. Inoculação dos suínos

Foram selecionados 24 suínos mestiços (Landrace x Large White) SPF produzidos no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Concórdia - SC. Estes foram divididos em três grupos (A, B e C), cada um composto de oito animais (Quadro 01).

Cada animal, antes da inoculação, recebeu de 2 a 4 ml da seguinte mistura de tranqüilizantes: 1 ml de amaleato de acepromasina² 10mg/ml e 10ml de ketamina³ a 100mg/ml.

Três animais do grupo A foram escolhidos aleatoriamente e inoculados com *M. hyopneumoniae*, por via intra-traqueal, com três inoculações intervaladas de 24 horas. Os demais suínos do grupo foram mantidos em contato com estes animais. Da mesma forma três

²Acepromazine maleate infection. Lab. Tech America.

³Ketaset (ketamina - ECl). Lab. Aveco.

animais do grupo B foram inoculados com *M.flocculare* por via intranasal. Foram feitas quatro inoculações intervaladas de 24 horas. Outros cinco suínos foram mantidos em contato. O volume do inóculo administrado em cada animal foi igual a 10 ml.

QUADRO 01 - Identificação dos suínos SPF empregados no experimento.

Número do animal	Sexo	Idade à primeira inoculação (dias)	Grupo
44	F	86	A
45	F	86	A
52	M	84	A
55	F	84	A
56	F	84	A
61	M	84	A
64	M	84	A
66	F	84	A
35	M	91	C ₁
40	F	86	C ₁
62	F	84	C ₁
69	M	84	C ₁
30	M	91	B
43	M	86	B
48	F	86	B
49	F	86	B
53	M	84	B
59	F	84	B
60	F	84	B
63	M	84	B
36	F	91	C ₂
50	F	86	C ₂
51	F	86	C ₂
71	F	84	C ₂

O grupo C foi designado grupo controle. Foi feita uma subdivisão dos animais do grupo C em: subgrupo C₁ (animais

identificados com os números 35, 40, 62 e 69) e C₂ (36, 50, 51 e 71). Os quatro animais do subgrupo C₁, foram mantidos como controle relativo aos animais do grupo A e os animais do subgrupo C₂ relativo aos animais do grupo B.

Todos os animais do experimento foram mantidos em total isolamento, tomando todas as medidas necessárias para que não sofressem infecções por outros microrganismos.

Semanalmente foram feitas colheitas de amostras de sangue e exame clínico, baseado na inspeção visual, de todos os suínos.

3.1.3. Necrópsia

Os suínos do grupo A foram abatidos 8 semanas após a inoculação (pi) e os do grupo B, 14 semanas pi. Junto com o abate do grupo A foram também abatidos os animais pertencentes ao subgrupo C₁ e junto com os suínos do grupo B foram abatidos os demais controles negativos (subgrupo C₂).

O sacrifício dos animais foi feito através de choque elétrico e sangria asséptica pela veia jugular para a colheita do sangue total. Separou-se o soro, o qual foi empregado nos testes sorológicos. Abriu-se assepticamente o tórax dos suínos, tomando-se os cuidados necessários para se evitar a contaminação do sistema respiratório.

Fez-se o exame macroscópico da cavidade torácica e seus órgãos. Foi determinado o percentual de hepatização pulmonar segundo PIFFER e BRITO (1990). O volume relativo de cada lobo em relação ao volume total do pulmão foi o seguinte: lobo apical direito e cardíaco direito = 0,11; lobo apical esquerdo e cardíaco esquerdo = 0,06; diafragmático direito = 0,34; diafragmático esquerdo = 0,27, e intermediário = 0,05 (números descritos em porcentagem).

Amostras de pulmões com dimensão aproximada de 3,0 X 2,0 X 1,5 cm, foram colhidas assepticamente para os seguintes exames: isolamento de micoplasmas, testes bacteriológicos e histopatológico.

Foram feitos cortes transversais nos focinhos de todos os animais para avaliar o grau de comprometimento das conchas nasais de acordo com método descrito por MARTINS et al. (1985).

Foram colhidas amostras das tonsilas e "swabs" dos cornetos nasais, as quais foram submetidas a testes bacteriológicos e exame anátomo-patológico.

3.1.4. Exames histopatológicos

Colheram-se amostras do pulmão de todos os leitões necropsiados e observados quanto a presença ou ausência de lesões macroscópicas. Estas amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10%, posteriormente, desidratadas, diafanizadas e cortadas a cinco micrômetros. Os cortes foram laminados, corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e examinados ao microscópio ótico.

3.1.5. Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

Nos pulmões com lesões, as amostras foram colhidas na junção do tecido lesado com o tecido normal. Estas amostras foram maceradas em um gral com areia estéril. Acrescentou-se ao macerado meio de Friis num volume aproximado de 10%. As soluções contendo o macerado foram diluídas até 1:10⁷ em meio de Friis e incubadas a 37°C sob agitação, até que se observou mudança da coloração, um indicativo de crescimento de microrganismo, possivelmente *M. hyopneumoniae* ou *M. flocculare*. Após cinco passagens em caldo, cultivou-se as amostras em meio sólido de Friis (FRIIS, 1975) e estas foram incubadas em condições de microaerofilia a 37°C por aproximadamente 7 dias.

Foram feitas leituras diárias das culturas em meio sólido com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

3.1.6. Teste de imunofluorescência

As amostras isoladas em meio de cultura descritas no item anterior foram centrifugadas após 3 dias de incubação sob as condições já citadas. O sedimento foi colocado em lâmina de microscopia e fixado pelo calor. Montou-se duas lâminas para cada amostra colhida de cada animal empregado no experimento (suínos SPF dos grupos A, B e C). Cada lâmina foi mergulhada por 10 minutos em metanol absoluto e secou-se a mesma ao ar. Depois foram feitas duas lavagens da lâmina com PBS, pH 7,5, sob agitação e com uma duração de 5 minutos cada. A coloração das lâminas foi feita segundo AMANFU et al. (1984). Foi feita a contra-coloração com azul de Evans durante 2 minutos e depois lavado duas vezes com água destilada deionizada e seca ao ar. A lâmina foi montada utilizando "phosphate buffered glycerin", pH 7,4.

Procedeu-se a leitura em microscópico de fluorescência binocular, equipado com condensador de campo escuro e lâmpada a vapor de mercúrio Osram HBO 200. Foram usados os filtros excitador azul (BG12) e barreira amarelo (K530).

3.1.7. Testes bacteriológicos

Submeteu-se as amostras a testes bacteriológicos objetivando a observação da presença dos seguintes agentes patogênicos das vias respiratórias dos suínos: *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

As amostras colhidas durante a necrópsia foram transportadas assepticamente para o Laboratório de Bacteriologia, onde foram realizados os exames bacteriológicos.

3.2. Avaliação de um "kit" comercial de diagnóstico da pneumonia micoplásmica suína

Foi avaliado o "Enzyme Immunoassay Kit Dr. Bommeli"⁴, o qual realiza o diagnóstico sorológico da PMS através do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto. Para esta avaliação, empregou-se as amostras de soro colhidas 8 (grupos A e C₁) e 14 (grupos B e C₂) semanas pi. Seguiu-se as recomendações do fornecedor para armazenar o "kit" e para executar os testes. Todos os reagentes empregados faziam parte do "kit".

Cada amostra de soro foi testada em duplicata e, depois, repetiu-se o teste. Desta forma obteve-se quatro leituras de cada amostra.

Procedeu-se diluições 1:100 das amostras de soro a testar (soros dos animais dos grupos A, B e C), soro controle negativo e soro controle positivo e colocou-se 0,2 ml destas soluções nos pocinhos. Cada amostra ou controle ocupou 2 pocinhos vizinhos. A microplaca foi coberta com uma tampa plástica, agitada por 15 segundos e incubada em câmara úmida a 37°C por 1 hora.

Após este período, agitou-se suavemente a microplaca lavando-a por três vezes, com intervalo de 3 minutos entre cada lavagem.

⁴ Dr. Bommeli AG. 0059/1/89. Stationsstrasse 12, CH - 3097, Liebefeld-Bern. Switzerland.

Imediatamente após, adicionou-se o conjugado previamente diluído a 1:200. Colocou-se 0,2 ml da solução em cada pocinho da microplaca. Esta foi novamente coberta, agitada por 15 segundos e incubada em uma câmara úmida a 37°C por 1 hora.

Após este período a microplaca foi lavada como já descrito.

O próximo passo foi a adição de 0,2 ml da solução cromogênica a cada pocinho. Cobriu-se a microplaca e esta foi mantida no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação, a microplaca foi agitada levemente e acrescentou-se a solução para interromper a reação (50µl em cada pocinho). Novamente a microplaca foi agitada suavemente e procedeu-se a leitura dos resultados.

Foi feita a leitura da densidade ótica a 405nm e foram calculadas as médias das absorvâncias de cada amostra.

Para a interpretação dos resultados, subtraiu-se o valor médio do controle negativo de todos os valores médios das amostras e, inclusive, do controle positivo. A leitura do controle positivo menos a do controle negativo foi considerado 100% e o seguinte "score" foi estabelecido pelo fornecedor para a interpretação dos resultados:

<50% = negativo

50 - 70% = suspeito

>70% = positivo

As médias das absorvâncias dos três grupos foram comparadas estatisticamente através do teste "student" (teste t). Foram, ainda, calculados os seguintes valores para avaliar a performance do "kit" de diagnóstico: sensibilidade, especificidade, valor predictivo teste positivo, valor predictivo teste negativo, razão probabilística dos resultados do teste, segundo TYLER e CULLOR (1989).

3.3. Produção de antígeno para o teste de fixação de complemento.

Duas cepas de *M. hyopneumoniae* foram empregadas para a preparação do antígeno para o teste de fixação de complemento:

- Cepa 11. ATCC 25095. Jan/15/81. MED555.
- Cepa J. ATCC 27715 FCX3 SUB-27. June/19/73. MED555.

Inicialmente foram feitas de três a cinco passagens das amostras supracitadas em meio de Friis. Foram produzidas três partidas de antígeno, identificadas como: 1, 2 e 3.

Para a produção da partida 1 inoculou-se 500 ml de meio de cultura com a cepa 11 de *M. hyopneumoniae*, a qual sofreu cinco passagens no laboratório e apresentou uma UMC igual a 10^8 . O meio de cultura empregado foi também o meio de Friis sem antibióticos, porém adicionou-se soro de suínos SPF tratado com ácido por 3 horas. O tratamento ácido do soro foi feito segundo SWITZER (1972).

Para a produção das demais partidas de antígeno empregou-se a amostra J de *M. hyopneumoniae*, com três passagens e UMC igual a 10^9 . Na produção da partida 3 do antígeno, utilizou-se o meio de Friis também sem antibiótico, mas com soro de eqüino normal com tratamento ácido de 18 horas (SWITZER, 1972).

Após a inoculação dos meios com as amostras como descrito acima, o mesmo foi incubado a 37°C . A partida 1 foi incubada sob agitação e as seguintes, em repouso. Após 4 dias de incubação, o pH do meio atingiu 6,8 e uma leve opacidade foi observada. Considerou-se este o ponto de crescimento ideal, segundo HODGES e BETTS (1969). Este material foi então centrifugado a $14.000\times g$ por 30 minutos, lavado duas vezes com tampão veronal pH 7,4. O sedimento final foi ressuspendido em 5 ml de tampão veronal. Esta solução foi então aquecida a 50°C por 30 minutos em banho-maria e estocada a -70°C (MORI et al., 1983).

3.4. Produção de antígeno para o teste imunoenzimático.

Foram produzidas duas partidas de antígeno para o teste imunoenzimático segundo NICOLET e PAROZ (1980), as quais foram identificadas como partidas 4 e 5, seguindo a ordem de produção.

Utilizou-se a cepa J⁵ de *M. hyopneumoniae*. Esta amostra foi cultivada em meio de Friis adicionado de soro de eqüino normal. O soro foi tratado com ácido por 18 horas como descrito por SWITZER (1972). Este material foi incubado a 37°C sem agitação até que o meio adquiriu uma coloração amarela. Este ponto foi atingido com 3

⁵Strain J. ATCC 27715 FCX3 SUB-27. June/19/73. MED555.

dias de incubação. Mediu-se a UMC que foi igual a 10^9 e também o pH que foi igual a 6,8. Este material foi centrifugado a 14.000xg por 30 minutos. O sedimento foi lavado três vezes com PBS pH 7,2. O sedimento final foi ressuscitado em 3 ml de PBS pH 7,2.

A extração do antígeno foi feita com Tween20. Misturou-se volumes iguais da solução de antígeno com Tween20 a 2% em PBS pH 7,2. Esta solução foi então incubada a 37°C por 90 minutos, com agitação ocasional. Centrifugou-se a solução a 50.000xg por 1 hora e colheu-se o sobrenadante, que foi filtrado em filtro millipore (membrana 0,22 μ m) e dispensado em tubos eppendorf em volumes de 0,5 ml.

Mediu-se a concentração de proteínas de cada partida de antígeno num espectrofotômetro equipado com luz ultra-violeta segundo JOHNSTONE e THORPE (1988). A partida 4 apresentou a seguinte concentração: 56,69 μ g/ml e a partida 5 41,43 μ g/ml.

3.5. Padronização do teste de fixação de complemento

Para testar os antígenos produzidos, tentou-se montar e padronizar o teste de fixação de complemento. Para tal, seguiu-se o método descrito por LABORATORY BRANCH COMPLEMENT (1965).

Inicialmente foi obtida uma solução de hemácias de carneiro a 2,8% e esta foi sensibilizada com hemolisina.

O próximo passo foi a preparação do padrão de hemólise, usado na interpretação dos resultados. Uma solução de hemoglobina foi preparada misturando-se 1 ml da suspensão de hemácias a 2,8% com 7,0 ml de água destilada, provocando-se assim lise das hemácias. Preparou-se também uma suspensão de hemácias a 0,28%. O padrão de hemólise foi preparado segundo o Quadro - 02.

Marcou-se duas microplacas com fundo em "U", segundo a Figura 01. Uma terceira microplaca foi usada para controle do soro e da hemolisina.

QUADRO 02 - Distribuição dos reagentes para a produção do padrão de hemólise.

Reagentes	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hemoglobina	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Hemácias	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0
% de Hemólise	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

LEGENDA: Hemoglobina = solução de hemoglobina e hemácias = suspensão de hemácias a 0,28%.

FIGURA 01 - Distribuição dos reagentes na microplaca para a padronização das partidas de antígeno produzidas para o teste de fixação de complemento.

	diluição do soro										PH	c5	c2,5
	8	16	32	64	128	256	612	1024	2040				
1:1											0		
1:2											1		
1:4											2		
1:8											3		
1:16											4		
1:32											5		
1:64											6		10
1:128											7	8	9

↑ diluição do antígeno

O soro padrão positivo (soros de suínos SPF inoculados com *M. hyopneumoniae* - grupo A) empregado no teste foi inativado a 56°C por 30 minutos e diluído de 1:8 a 1:2048. O antígeno foi diluído até 1:128. Estes reagentes foram então distribuídos no volume de 50µl por pocinho, como mostra a Figura 01. O soro

também foi distribuído na terceira microplaca, reservada para o controle do mesmo.

O próximo passo foi adicionar o complemento na diluição ótima previamente estabelecida pelos técnicos do Laboratório de Bacteriologia do CNPSA - EMBRAPA (título 1:86). Foram adicionados 50µl da solução de complemento em todos os poços com exceção do controle da hemolisina, c'2,5 e no padrão de hemólise. Na coluna c'2,5 foram adicionados 25µl da solução de complemento.

As microplacas foram cobertas, agitadas por 15 segundos e refrigeradas por 18 horas.

Após este período de tempo, adicionou-se 25µl de hemácias sensibilizadas em todos os pocinhos, com exceção do padrão de hemólise, agitou-se as microplacas por 15 segundos e estas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após a incubação foram centrifugadas a 0,30xg por 5 minutos e procedeu-se a leitura dos resultados.

3.6. Padronização do Teste imunoenzimático

Da mesma forma que o teste de fixação de complemento, tentou-se montar e padronizar o teste imunoenzimático para testar as duas partidas de antígeno produzidas (partida 3 e partida 4). Para tal seguiu-se o método descrito por JACOBSON e DOWNING (1991) para titular o antígeno. As etapas do teste imunoenzimático foram executadas segundo NICOLET e PAROZ (1980) e BRUGGMANN e KELLER (1977).

Foram realizadas seis provas para testar as duas partidas de antígeno, com uma repetição de cada prova. Os fatores variantes de uma prova para outra foram as partidas e as concentrações iniciais do antígeno, como mostra o Quadro 03.

Denominou-se concentração inicial do antígeno àquela diluição colocada na primeira coluna da microplaca e que, a partir dela, foram realizadas as demais diluições.

As microplacas foram impregnadas com 200µl da solução de antígeno desde de a concentração inicial até a diluição 1:1024 (Figura 02). A coluna número 12 foi usada para os controles dos demais reagentes (controle negativo).

QUADRO 03 - Concentração inicial de cada partida de antígeno nas seis provas realizadas.

PROVAS	CONCENTRAÇÃO INICIAL ($\mu\text{g/ml}$)	
	partida 4	partida 5
Prova 1	10,00	10,00
Prova 2	20,00	20,00
Prova 3	56,69**	41,13**

LEGENDA: **Soluções sem diluição.

Uma vez com as diluições corretas do antígeno, a microplaca foi agitada por 5 minutos, coberta e incubada a 4°C por 18 horas dentro de uma câmara úmida. Depois procedeu-se a lavagem da microplaca por quatro vezes, com intervalo de 1 minuto entre cada lavagem.

FIGURA 02 - Disposição das diluições da solução de antígeno na microplaca.

	*	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LEGENDA: * concentração inicial e ** controle negativo.

Imediatamente após retirar toda a solução de lavagem da microplaca, acrescentou-se 100 μl de uma solução de bloqueio em todos os pocinhos. Em seguida, a microplaca foi agitada por 5 minutos, coberta e incubada a 37°C por 1 hora. Após este período, procedeu-se novamente a lavagem da microplaca como já descrito. O

próximo passo foi acrescentar 100 µl da solução do soro padrão positivo e do soro padrão negativo, na diluição 1:100, dispostos de acordo com a Figura 03.

Empregou-se os soros dos suínos SPF citados no item 3.1, como soro padrão. Os soros dos suínos inoculados com *M. hyopneumoniae* (grupo A) colhidos no oitava semana pi, foram empregados como soro padrão positivo; os soros dos suínos inoculados com *M. flocculare* (grupo B) colhidos na décima quarta semana pi, foram utilizados para controle da especificidade do teste, e o soro dos suínos do grupo controle, como soro padrão negativo.

A microplaca foi coberta, agitada por 15 segundos e incubada a 37°C por 1 hora. Procedeu-se a lavagem da microplaca como já descrito e acrescentou-se 100µl da solução de conjugado (peroxidase conjugada com IgG anti-suíno⁶) em todos os pocinhos. Novamente a microplaca foi coberta, agitada por 15 segundos, incubada a 37°C por 1 hora e lavada. A etapa seguinte foi a adição de 100µl da solução cromogênica (ABTS - 2,2'-azino-di(3-ethyl-benzoline-6-sulfonate)) em todos os pocinhos. Cobriu-se a microplaca, agitou a por 15 segundos e esta foi mantida no escuro a temperatura ambiente (23-24°C) por 30 minutos. Após este período procedeu-se a leitura dos resultados.

FIGURA 03 - Disposição, na microplaca, das amostras de soro testadas, identificadas com o número do animal.

	Grupo A				Grupo B				Grupo C			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	44	44	66	66	35	35	71	71	30	30	63	63
B	45	45	64	64	36	36	69	69	43	43	60	60
C	52	52	61	61	40	40	62	62	48	48	59	59
D	55	55	56	56	50	50	51	51	49	49	53	53
E	56	56	55	55	51	51	50	50	53	53	49	49
F	61	61	52	52	62	62	40	40	59	59	48	48
G	64	64	45	45	69	69	36	36	60	60	43	43
H	66	66	44	44	71	71	35	35	63	63	30	30

⁶Proszido pelo Laboratório de Bacteriologia do CNPSA - EMERAPA

4. RESULTADOS

4.1. Reprodução da pneumonia micoplásmica em suínos SPF

4.1.1. Exames clínico e anátomo-histopatológico

Clinicamente, observou-se que os animais pertencentes ao grupo A apresentaram os sintomas típicos de pneumonia micoplásmica suína (PMS), caracterizados por tosse seca intermitente, observada pela primeira vez 3,5 semanas após a inoculação.

Ao exame macroscópico dos pulmões (grupo A) observou-se, áreas de hepatização bem delimitadas, com coloração avermelhadas ou acinzentadas e de consistência firme, localizadas predominantemente na porção ventral dos lobos apicais, cardíacos, intermediário e, as vezes, do diafragmático. Os percentuais de hepatização pulmonar estão descritos no Quadro 04.

O exame histológico revelou tratar-se de uma broncopneumonia subaguda ou crônica, caracterizada por infiltrado inflamatório de mononucleares linfócitos na parede bronquial e perivascular. Observou-se, também, hiperplasia e hipertrofia de folículos linfóides peribronquial e peribronquiolar, e, exsudação predominantemente purulenta intra-alveolar. O epitélio bronquial e bronquiolar, as vezes apresentava destruição parcial de células ciliadas. Estas lesões foram mais severas nos animais 44, 45, 61 e 66, e mais branda nas amostras dos animais 52, 55, 56 e 64.

Os animais dos grupos B e C não apresentaram sinais clínicos e lesões de pneumonia ou outra doença. Todo o epitélio ciliado das vias respiratórias destes animais estava normal, sugerindo ausência de infecção por *M. hyopneumoniae*.

Um animal do grupo A (número 55), 2 animais do grupo B, (59 e 62) e três do grupo C (36, 50 e 40), apresentaram ao exame anatomopatológico, uma pequena lesão bem delimitada, de coloração avermelhada e superfície deprimida, na extremidade de alguns lobos pulmonares, cujo exame histopatológico, revelou tratar-se de pequenas áreas de atelectasia e, portanto, sem nenhum significado patológico.

Todos os suínos (grupos A, B e C) apresentaram os cornetos nasais e as tonsilas normais. Também não apresentaram qualquer lesão significativa em outro órgão.

4.1.2. Isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae*

Todos os tubos cultivados com amostras pulmonares dos animais dos grupos A e B apresentaram modificações na coloração do meio (Quadro 04), indicando mudança de pH. Este fato indica o isolamento de micoplasma.

Nas primeiras passagens, o meio de cultura apresentou mudança de coloração com ± 5 dias de incubação. A partir da terceira passagem, a mudança de coloração ocorreu com 60 a 72 horas de incubação.

Os tubos cultivados com as amostras dos animais do grupo C não apresentam mudança de cor significativa, indicando ausência de crescimento microbiano, no caso, de micoplasmas.

Após a quinta passagem em caldo, as amostras foram cultivadas em meio sólido de Friis (FRIIS, 1975). Neste meio, observou-se, com o auxílio de um microscópio estereoscópio, o crescimento de colônias típicas de *M. hyopneumoniae*, nas placas cultivadas com as amostras dos animais do grupo A. Nas placas inoculadas com as amostras dos animais do grupo B, observaram-se colônias típicas de *M. flocculare* e as placas inoculadas com as amostras do grupo C, não apresentaram qualquer crescimento microbiano.

As colônias suspeitas de serem *M. hyopneumoniae* ou *M. flocculare*, cresceram no meio sólido gradativamente, só se tornaram visíveis após 3 dias de incubação e permaneceram íntegras por cerca de 9 dias. Após 4 dias de incubação, as colônias se apresentavam de forma uniforme, com elevações refratárias no ágar e com, aproximadamente, 0,03 a 0,05 mm.

A confirmação do isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae* de pulmões dos animais do grupo A foi feita através do teste de imunofluorescência. Neste teste, todas as amostras dos animais do grupo A foram consideradas fortemente positivas, confirmando o resultado de isolamento. Já as amostras dos animais dos grupos B e C foram consideradas negativas e este fato denota a especificidade do conjugado utilizado (IgG anti-suíno conjugada com isotiocianato de fluoresceína).

QUADRO 04 - Isolamento de *Mycoplasma hyopneumoniae* e presença de lesões morfológicas compatíveis com a PMS nos animais do grupo A.

LEITÃO	ISOLAMENTO DE Mh (UMC*)	LESÕES MORFO- PATOLOGICAS**
44	10 ⁷	6,2
45	10 ⁴	2,1
52	10 ³	8,1
55	10 ⁵	6,9
56	10 ⁶	2,1
61	10 ⁷	2,1
64	10 ⁶	2,1
66	10 ⁷	0,7

LEGENDA: * = unidade de mudança de cor e ** = percentagem de hepatização pulmonar.

4.1.3. Testes bacteriológicos

Nenhuma bactéria patogênica para o sistema respiratório foi encontrada a partir das amostras de pulmões, das tonsilas e secreções nasais de todos os animais do experimento.

4.2. AVALIAÇÃO DO "KIT" COMERCIAL DE DIAGNÓSTICO DA PMS

A absorvância média do controle negativo foi igual a 0,41775 e do controle positivo 1,698. O resultado da subtração do controle positivo menos o controle negativo foi igual a 1,27425 e esta leitura foi tomada como 100%.

Foram calculadas as médias das absorvâncias de cada amostra, que estão descritas nos Quadros 05, 06 e 07, e demonstradas graficamente nas Figuras 04, 05 e 06.

QUADRO 05 - Resultados do teste imunoenzimático ("kit" Bommeli), feito com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo A inoculados com *Mycoplasma hyopneumoniae*:

Número do animal	Absorvância média	Resultados da subtração do controle negativo	%	Interpretação
44	0,8605	0,44275	34,75	-
45	1,4770	1,05925	83,13	+
52	0,5350	0,11725	09,20	-
55	0,5405	0,12275	09,63	-
56	0,9565	0,53875	42,28	-
61	0,7380	0,32025	25,13	-
64	1,0850	0,66725	52,36	susp
66	1,2410	0,82325	64,61	susp

LEGENDA: - = negativo, + = positivo e susp = suspeito

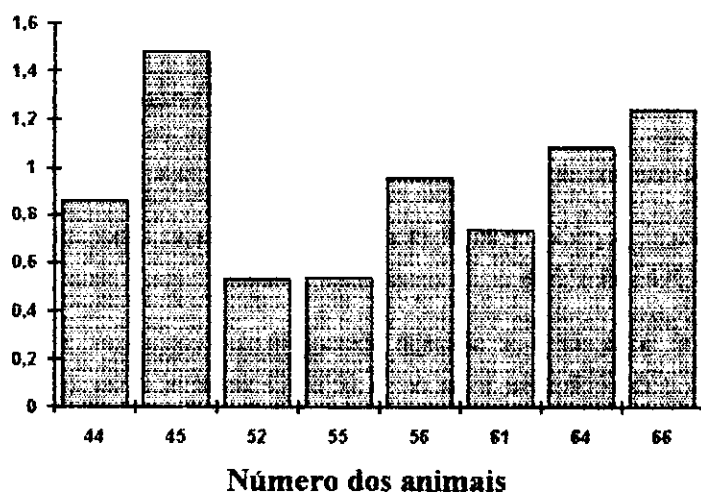


FIGURA 04 - Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo A.

QUADRO 06 - Resultados do teste imunoenzimático ("kit" Bommeli), feito com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo B inoculados com *Mycoplasma flocculare*:

Número do animal	Absorvância média	Resultados da subtração do controle negativo	%	Interpretação
30	0,3345	-0,08325	@	-
43	0,3930	-0,02475	@	-
48	0,3270	-0,90750	@	-
49	0,4685	-0,05075	@	-
53	0,3985	-0,01925	@	-
59	0,3050	-0,11275	@	-
60	0,4235	0,00575	0,45	-
63	0,3825	-0,03525	@	-

LEGENDA: @ = porcentagem negativa e - = negativo.

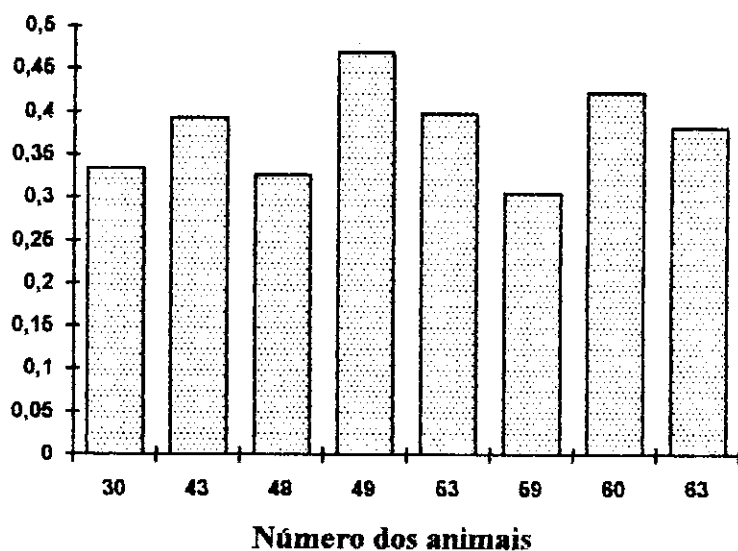


FIGURA 05 - Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo B.

QUADRO 07 - Resultados do teste com as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo C (controle negativo).

Número do animal	Absorvância média	Resultados da subtração do controle negativo	%	Interpretação
36	0,3240	-0,09375	@	-
50	0,4485	-0,03075	2,41	-
51	0,4015	-0,01625	@	-
62	0,4235	0,00575	0,45	-
69	0,3560	-0,06175	@	-
71	0,2785	-0,13925	@	-

LEGENDA: @ = porcentagem negativa e - = negativo.

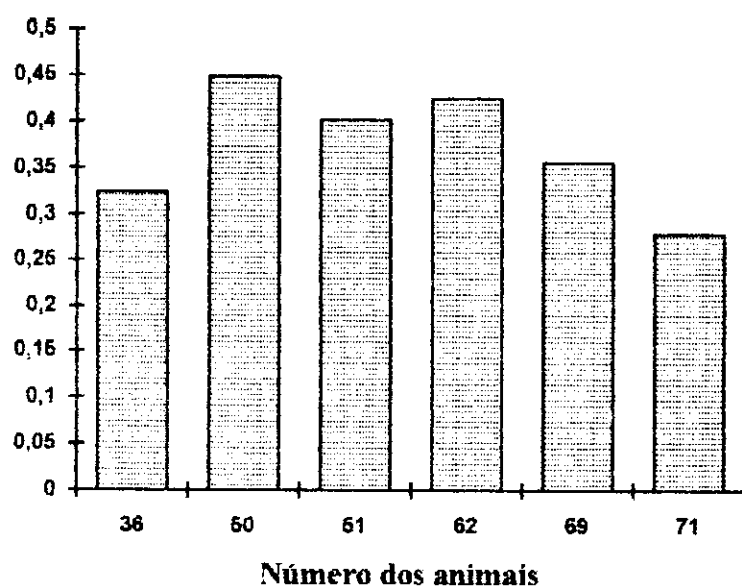


FIGURA 06 - Esquema gráfico das absorvâncias médias resultantes das provas de avaliação do "kit Bommeli" - Grupo C.

Como demonstrado no Quadro 05, apenas um animal do grupo A apresentou sorologia positiva no ELISA utilizado e dois foram considerados suspeitos. Todos os leitões dos grupos B e C foram sorologicamente negativos no ELISA (Quadros 06 e 07).

QUADRO 08 - Quadro de contingência para a associação do "status" da PMS com o "status" frente ao teste imunoenzimático.

		"Status" da doença (PMS)	
		+	-
"Status" do ELISA	+	1 (a)	0 (b)
	-	7 (c)	16 (d)

$$\text{Sensibilidade} = a / (a + c) = 1 / (1 + 7) = 0,125$$

Assim, a probabilidade do teste imunoenzimático (ELISA) testado, de identificar um animal verdadeiramente positivo é de 12,5%.

$$\text{Especificidade} = d / (b + d) = 16 / (0 + 16) = 1$$

A probabilidade deste ELISA de identificar um animal verdadeiramente negativo é de 100%.

$$\text{Valor predictivo teste positivo} = a / (a + b) = 1 / (1 + 0) = 1$$

A probabilidade de que um animal com ELISA positivo esteja doente é de 100% (valor predictivo positivo).

$$\text{Valor predictivo teste negativo} = d / (c + d) = 16 / (7 + 16) = 0,69$$

A probabilidade de que um animal com ELISA negativo esteja sem a doença é de 69% (valor predictivo negativo).

A densidade ótica (DO) média dos soros dos animais do grupo A foi igual a 0,9292, a do grupo B igual a 0,3791 e do grupo

C 0,372 (Figura 07). As DOs dos grupos B e C ($P > 0,08$, teste t) não diferiram entre si, porém ambas foram significativamente menores que aquelas do grupo A ($P < 0,005$, teste t).

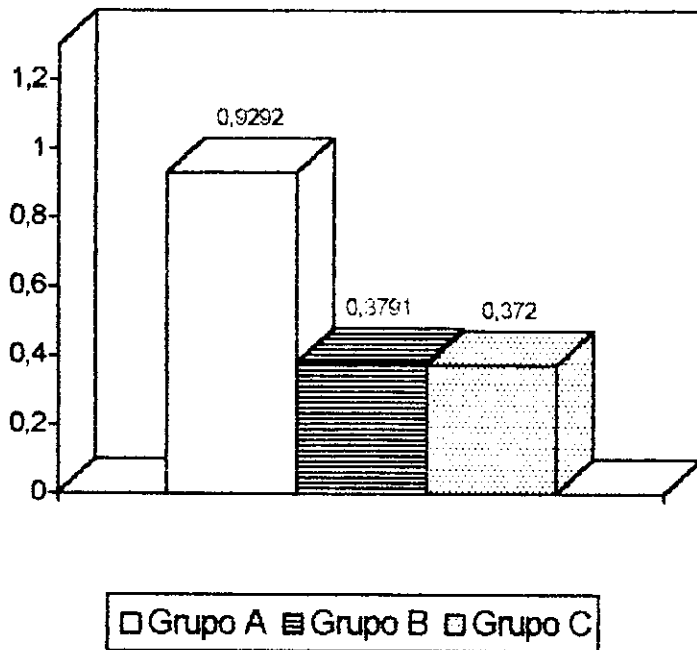


FIGURA 07 - Esquema gráfico das médias das absorvâncias de cada grupo.

4.3. Padronização do antígeno para o teste de fixação de complemento

Nas figuras 08, 09, 10, 11, 12 e 13 são reproduzidas cada célula da microplaca e mostram os resultados das provas de padronização das partidas de antígeno 1, 2 e 3, produzidas para o teste de fixação de complemento. Os números apresentados dentro de cada célula correspondem às porcentagens de hemólise observadas e comparadas com o padrão de hemólise (PH). Assim, 0 corresponde a 0% de hemólise, 1 a 10%, 2 a 20% e assim sucessivamente até 10 que corresponde a 100% de hemólise.

FIGURA 08 - Resultado da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 1.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
C	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
D	5	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0
E	7	0	1	0	0	0	0	0	1	4	4	1
F	7	0	2	1	1	1	1	2	3	5	6	3
G	9	7	6	4	3	3	4	5	4	6	8	10
H	10	9	8	7	5	5	7	8	6	7	8	9

FIGURA 09 - Resultados da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 1.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
D	3	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0
E	5	0	1	0	0	0	0	0	1	4	3	1
F	7	0	2	2	1	1	1	2	2	5	7	3
G	7	5	6	4	4	3	4	4	3	6	8	10
H	9	8	7	7	5	6	7	8	6	7	8	9

FIGURA 10 - Resultados da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 2.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
C	3	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0
D	4	3	0	0	0	0	1	2	5	3	3	0
E	5	5	1	0	0	0	3	3	6	4	4	2
F	6	6	6	1	0	0	4	5	6	5	5	2
G	8	7	7	2	3	2	5	5	6	6	6	10
H	9	8	7	4	4	4	6	6	7	7	8	9

FIGURA 11 - Resultados da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 2.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
C	3	1	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0
D	3	3	0	0	0	0	1	0	5	3	1	0
E	5	4	2	0	0	0	2	1	6	4	2	1
F	7	6	4	2	1	1	4	3	6	5	4	2
G	8	7	6	3	3	2	5	5	6	6	6	10
H	9	8	7	4	4	4	6	6	7	7	8	9

FIGURA 12 - Resultados da primeira prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 3.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	2	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
C	2	2	2	2	1	3	1	1	1	2	1	0
D	4	3	2	2	2	6	3	3	4	3	2	1
E	5	4	2	2	3	6	4	6	6	4	2	2
F	6	6	6	7	7	7	7	7	7	5	3	2
G	7	8	8	7	7	8	8	8	7	6	4	10
H	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	9

FIGURA 13 - Resultados da segunda prova de padronização do antígeno, utilizando a partida 3.

	PH											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0
B	2	1	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0
C	2	2	1	1	1	2	1	1	-	2	1	0
D	4	3	2	2	2	3	3	2	-	3	3	1
E	5	4	4	3	4	4	5	4	-	4	5	2
F	6	5	5	6	6	6	6	6	-	5	7	3
G	7	6	6	7	7	8	7	7	-	6	8	10
H	8	7	8	8	8	8	8	8	-	7	8	9

LEGENDA: - resultados nulos devido a erro técnico.

Não foi observada hemólise nos controles da hemolisina e nos controles do soro, observou-se de 75 a 95% de hemólise.

4.4. Padronização dos antígenos produzidos para o teste imunoenzimático

As Figuras 14 e 15 mostram as absorvâncias médias obtidas nas leituras das seis provas executadas para testar as partidas 4 e 5 de antígeno produzidas para o teste imunoenzimático nas concentrações iniciais de 10µg/ml, 20µg/ml e solução integral. Os resultados foram praticamente iguais a zero, com exceção das amostras colocadas nas células A1, B1, C1, D1, E1 e F1 do teste da partida 5, que apresentaram absorvâncias médias mais altas.

FIGURA 14 - Médias das absorvâncias lidas nas seis provas executadas para testar a partida 4 de antígeno para o teste imunoenzimático.

	Grupo A				Grupo B				Grupo C			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,002	0,003	0,000	0,001	0,005	0,001	0,003	0,004	0,004	0,003	0,007	0,004
B	0,001	0,005	0,004	0,004	0,006	0,005	0,007	0,004	0,003	0,004	0,003	0,007
C	0,002	0,001	0,003	0,003	0,004	0,004	0,002	0,003	0,003	0,002	0,005	0,004
D	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002	0,001	0,003
E	0,002	0,008	0,003	0,006	0,004	0,004	0,004	0,06	0,005	0,004	0,006	0,004
F	0,000	0,002	0,001	0,004	0,003	0,004	0,001	0,002	0,006	0,001	0,006	0,001
G	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,003	0,000	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001
H	0,001	0,003	0,003	0,003	0,000	0,005	0,003	0,001	0,004	0,003	0,001	0,000

FIGURA 15 - Médias das absorvâncias lidas nas seis provas executadas para testar a partida 5 de antígeno para o teste imunoenzimático.

	Grupo A				Grupo B				Grupo C			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,227	0,004	0,008	0,008	0,009	0,008	0,004	0,008	0,009	0,010	0,010	0,010
B	0,222	0,007	0,005	0,003	0,002	0,003	0,005	0,004	0,005	0,004	0,006	0,003
C	0,222	0,001	0,003	0,004	0,004	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007
D	0,212	0,007	0,008	0,007	0,007	0,009	0,007	0,008	0,007	0,009	0,008	0,009
E	1,207	0,004	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003	0,05	0,003	0,004	0,004	0,004
F	0,232	0,001	0,005	0,005	0,006	0,005	0,005	0,006	0,005	0,006	0,007	0,006
G	0,012	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,010	0,009	0,008
H	0,008	0,005	0,007	0,007	0,004	0,007	0,005	0,005	0,008	0,007	0,008	0,008

5. DISCUSSÃO

Nos estudos experimentais da PMS é muito difícil induzir a doença em todos os animais inoculados⁷. No presente caso, sintomatologia clínica e lesões morfológicas da PMS foram observadas em todos os animais do grupo A e também se isolou *Mycoplasma hyopneumoniae* de todos. As lesões morfológicas observadas não foram muito severas, uma vez que esta severidade das lesões da PMS estão, geralmente, associadas a infecções secundárias, principalmente por *Pasteurella multocida* sorotipo A, a qual não foi inoculada ou isolada dos animais do experimento.

Em outros estudos de reprodução experimental da PMS a soroconversão para o *M.hyopneumoniae* ocorreu entre a 1 e 5 semanas pi (ARMSTRONG et al., 1983; KOBISCH e NICOLET, 1987; LLOYD et al., 1987; KAZAMA et al., 1989; BERETTER et al., 1990; FELD et al., 1992) e entre 4 e 8 semanas em animais mantidos em contato com animais inoculados (ARMSTRONG et al., 1983; LLOYD et al., 1987; KAZAMA et al., 1989; BERETTER et al., 1990; FELD et al., 1992). Considerando-se que os animais do grupo A foram necropsiados 8 semanas pi era de se esperar um número maior de animais com sorologia positiva detectada pelo ELISA, uma vez que a doença foi registrada em todos os animais e confirmada pelo isolamento do *M.hyopneumoniae*. O ELISA utilizado (Dr. Bommeli) apresentou baixa sensibilidade para detectar animais recentemente infectados (8 semanas) e alta especificidade quando avaliado frente a soros de animais SPF não inoculados e em animais inoculados com *M.flocculare*. Por outro lado, o teste apresentou 100% de valor preditivo teste positivo e 100% de especificidade em relação ao *M.flocculare*, o qual é um habitante comum e apatogênico do sistema respiratório dos suínos. O "kit" avaliado pode ser empregado para definir o "status" sanitário de um rebanho para a PMS, mas na avaliação do resultado deve-se levar em consideração que 31% dos suínos verdadeiramente positivos podem ser identificados como negativo.

⁷INFORMAÇÃO VERBAL - PIFFER, I.A. CNPSA - EMBRAPA, Concórdia - SC. 1993.

Analisando estatisticamente os resultados da avaliação sorológica de todos os animais do experimento pelo "kit" comercial, observou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,8$) entre as DOs médias das amostras dos grupos C e B. Mas, constatou-se através do teste t que a média das DOs do grupo A foi significativamente diferentes das DOs dos grupos B e C ($P < 0,005$). Este fato também sugere uma especificidade de 100%, apesar de não se ter uma amostra suficientemente grande para comprovação desta hipótese através do teste t.

Existiu uma diferença significativa entre as DOs médias dos animais identificados como sorologicamente negativos do grupo A em relação aos animais sorologicamente negativos do grupo B. Estes dados sugerem uma necessidade de adequação da interpretação da leitura, por se tratar de leitões jovens e com lesões moderadas, talvez menores daquelas utilizadas na interpretação do "kit" comercial.

Nos resultados da padronização do teste de fixação de complemento, observou-se que em todas as provas ocorreu de 75 a 90% de hemólise nos pocinhos empregados para o controle do soro, o que foi considerado normal, uma vez que estes controles possuem o sistema hemolítico completo (hemácias sensibilizadas e complemento) e ausência de antígeno. Também o controle da hemolisina foi considerado perfeito em todas as provas, pois em nenhuma delas foi observada hemólise nestes poços. Estes controles continham hemácias sensibilizadas na ausência de complemento. O fato de não ter ocorrido hemólise indica a integridade das hemácias utilizadas e eficiência do tampão veronal, que não provocou hemólise. Porém, observando o resultado das leituras dos controles do complemento c'5 e c'2,5, observou-se baixa porcentagem de hemólise, principalmente nas diluições menores. Nestes controles estavam presentes o antígeno e o sistema hemolítico completo. Era esperado 100% de hemólise em todos os poços. A ausência de hemólise indicou anticomplementaridade das três partidas de antígeno testadas. O antígeno sozinho foi capaz de se ligar ao complemento, o qual não permaneceu livre para promover a lise das hemácias pela hemolisina. Esta propriedade anticomplementar das partidas de antígeno produzidas pelo método adotado, impede que as mesmas sejam usadas para o diagnóstico da PMS através do teste de fixação de complemento.

Na padronização dos antígenos produzidos para o teste imunoenzimático obteve-se leituras das absorvâncias semelhantes a zero, com exceção de 6 poços com leituras altas, mas atribuiu-se este resultado a erro técnico. Assim, constatou-se, que os antígenos produzidos foram ineficientes, uma vez que todos os demais reagentes empregados no teste foram testados anteriormente. Talvez, para a produção destes antígenos, tanto para o teste imunoenzimático como para o teste de fixação de complemento, o *M. hyopneumoniae* deva ser cultivado em meio de cultura não tão rico em proteína, como o é o meio de Friis. O excesso de proteínas no meio deve ter levado a anticomplementaridade do antígeno produzido para o teste de fixação de complemento. Por outro lado, o *M. hyopneumoniae* é muito exigente quanto aos componentes do meio de cultura e o cultivo deste microrganismo em meios pobres em proteína é muito difícil. Por isso, foi importante testar a produção destes antígenos, cultivando o micoplasma em meio de Friis, onde se desenvolve muito bem.

BEREITER et al. (1990) descreve a produção de antígeno para o teste imunoenzimático como descrito neste trabalho, porém acrescentando a purificação do mesmo por passagem em coluna de cromatografia, visando principalmente a remoção do Tween 20. ARMSTRONG et al., 1987; NICOLET et al., 1980; KOBISCH e NICOLET, 1987; MORI et al., 1987, e KAZAMA et al., 1989, citam a eficácia dos antígenos purificados para testes imunoenzimáticos empregados no diagnóstico da PMS. É possível que a não purificação do antígeno tenha contribuído largamente para a ineficácia do mesmo produzido neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

1. O esquema de inoculação de *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizado foi eficiente para induzir a pneumonia micoplásmica suína (PMS), uma vez que todos os animais inoculados (Grupo A) apresentaram lesões morfológicas de PMS e o agente inoculado foi isolado de todos eles.

2. O "Enzyme Immunoassay kit Dr. Bommeli" apresentou baixa sensibilidade para detectar animais recentemente infectados (8 semanas) e alta especificidade quando avaliado frente a soros de animais SPF infectados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae*, com *Mycoplasma flocculare* e suínos SPF não inoculados. O "kit" avaliado pode ser empregado para definir o "status" sanitário de um rebanho para a PMS, mas na avaliação do resultado deve-se levar em consideração que 31% dos suínos verdadeiramente positivos podem ser identificados como negativo.

3. Os métodos empregados para a produção dos antígenos para os testes de fixação de complemento e imunoenzimático, não foram eficientes.

7. SUMMARY

Three specific pathogen free (SPF) groups of pigs were inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae* intratracheally (group A) and three other ones with *Mycoplasma flocculare* intranasally (group B). Five SPF pigs of each group were exposed by contact with the inoculated pigs. A group of eight pigs were kept as control (group C), below the same others groups pigs conditions. Sera samples were collect from all three group before and weekly after inoculation. These sera samples were used as standard positive sera anti-*Mycoplasma hyopneumoniae*, standard positive sera anti-*Mycoplasma flocculare* and standard negative sera, to evaluate a commercial diagnose kit of mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) and antigens produced for complement fixation test and enzymelinked immunosorbent assay. The kit tested showed low sensitivity (31%) to detect antibody in the group A. On the other hand, the kit showed 100% of especificity with regard to *M.flocculare*. The methods used to produce antigens were inefficient.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANFU, W. et al. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by immunofluorescence. *American Journal of Veterinary Research*. v.45, n.7, p.1349-1352, 1984.
- ARMSTRONG, C.H. et al. Evaluation of criteria for the post-mortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v.48, n.3, p.278-281, 1984.
- ARMSTRONG, C.H. et al. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v.47, p.464-470, 1983.
- ARMSTRONG, C.H., SANDS-FREEMAN, L., FREEMAN, M.J. Serologica and cultural evaluations of swine infected experimentally with *Mycoplasma flocculare*. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v.51, n.2, p.185-188, 1987.
- BEREITER, M. et al. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Veterinary Microbiology*. v.25, p.177-192, 1990.
- BRUGGMANN, S., KELLER, H. Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma suis pneumoniae* in pigs' sera by an enzymelinked immunosorbent assay. *The Veterinary Record*. August 6, p.109-111, 1977.
- BUCH, D.G.S. The incidence and distribution of lung lesions, associated with enzootic pneumonia in pigs from 2 farms, and the effect of the extent of these lesions on weight gains. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY

- IBAYASHI, T. et al. Field studies of the effect of lincomycin feed medication for the treatment of mycoplasmal pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, July 1-5 1990, Switzerland. *Proceedings...* Switzerland: Scientific Committee of the 11th I.P.V.S. Congress, 1990. 511p. p.88.
- JACOBSON, R.H., DOWING, D.R., LYNCH, T.J. Computer-assisted enzyme immunoassays and simplified immunofluorescence assays: applications for the diagnostic laboratory and the veterinarian's office. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.181, n.10, p.1166-1168, 1982.
- JACOBSON, R.H., DOWING, D.R. *Software KE LA system*. Ithaca: Cornell University Research Foundation, 1991. 76p.
- JOHNSTONE, A., THORPE, R. *Immunochemistry in Practice*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988. 306p.
- KAZAMA, S., YAGIHASHI, T., SETO, K. Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v.53, n.2, p.176-181, 1989.
- KOBISCH, M., NICOLET, J. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of pigs. *Israel Journal of Medical Science*. v.23, p.644-646, 1987.
- KUBO, M. et al. Study on the effect of feed medication with lincomycin against artificial infection of mycoplasma pneumonia in swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, July 1-5 1990, Switzerland. *Proceedings...* Switzerland: Scientific Committee of the 11th I.P.V.S. Congress, 1990. 511p. p.90.
- LABORATORY BRANCH OF THE COMMUNICABLE DISEASE CENTER. Standardized Diagnostic Complement Fixation

- NICOLET, J., PAROZ, P. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Research in Veterinary Science*. v.29, p.305-309, 1980.
- PETERSON, G. et al. Response to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in nursing piglets. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, July 1-5 1990, Switzerland. *Proceedings...* Switzerland: scientific committee of the 11th I.P.V.S. Congress, 1990. 511p. p.84.
- PIFFER, I.A., BRITO, J.R.F. *Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos*. Concórdia, SC, EMBRAPA-CNPSA, 1990. 13p. (EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 23). ISSN: 0101 - 6245.
- POINTON, A.M., BYRT, D., HEAP, P. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Australian Veterinary Journal*. v.62, n.1, p.13-18, 1985.
- ROSS, R.F. Bacterial diseases: mycoplasmal diseases. In: ACLAND, H.M. et al. *Diseases of Swine*. 6.ed. Ames: The Iowa State University Press, 1986. 930p., p.469-475.
- STIPKOVITS, L. What about mycoplasma pneumonia. *Pigs*. v.6, n.3, p.27-29, 1990.
- SWITZER, W.P. Mycoplasmal pneumonia of swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.160, n.4, p.651-653, 1972. Appendix A.
- TAJIMA, M., YAGIHASHI, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity*. v.37, p.1162-1169, 1982.
- THOMAS, P. The influence of housing desing and some management systems on the health of the growing pig,