

CARLOS EDUARDO REAL PEREIRA

**Infecção por *Mycoplasma hyorhinis* em casos precoces de pneumonia micoplásmica
e comparação entre técnicas diagnósticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2014

P436i Pereira, Carlos Eduardo Real, 1987-
Infecção por *Mycoplasma hyorhinis* em casos precoces de pneumonia micoplásmica e
comparação entre técnicas diagnósticas / Carlos Eduardo Real Pereira. – 2014.

51 p. : il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

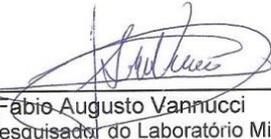
I. Suíno – Doenças – Teses. 2. Imunohistoquímica – Teses. 3. Infecções respiratórias –
Teses. 4. Pneumonia – Teses. 5. *Mycoplasma hyopneumoniae* – Teses. I. Guedes, Roberto
Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
III. Título.

CDD – 636.408 96

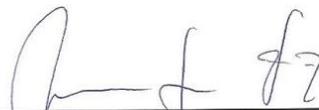
Dissertação defendida e aprovada em 22 de janeiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Roberto Mauricio Carvalho Guedes
Presidente - Orientador



Dr. Fábio Augusto Vannucci
Patologista/Pesquisador do Laboratório Microvet



Prof. José Lúcio dos Santos
Aposentado - UFV

Dedicada aos meus pais, João Carlos e Eliana,
a minha irmã Natália e a Isabella.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai João Carlos, pelo apoio, ensinamentos, incentivos e exemplo de vida e de profissionalismo. A minha mãe Eliana, pelo carinho, amor, ensinamentos e conselhos.

A Isabella, pelo amor, amizade, companheirismo e paciência

A minha irmã Natália e demais familiares, pelo convívio harmonioso e alegre.

Aos meus avôs, que lá de cima, iluminam meu caminho

Ao Prof. Roberto Guedes, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e exemplo de profissionalismo.

Aos professores do setor de Patologia, Prof^a Roselene Ecco, Prof^a Natália M. Ocarino, Prof^a Rogéria Serakides, Prof. Renato L. Santos e Prof^a Silvia A. França, pelo ensino de excelência e contribuição durante essa etapa da minha formação.

Ao Prof. Ernane F. Nascimento que, por gerações, disseminou seus conhecimentos em prol do ensino em patologia veterinária.

Ao Dr. Fabio Vannucci, pelo incentivo inicial na área de sanidade suína, pela participação na banca examinadora e contribuição para melhoria do presente trabalho.

Ao Prof. José Lúcio dos Santos, pela participação na banca examinadora e contribuição para melhoria do presente trabalho.

A MICROVET, pela cessão de parte do material utilizado neste trabalho.

A EMBRAPA, pela execução de algumas etapas deste trabalho.

A Danish Technical University, por ceder, gentilmente, controles positivos para os diferentes agentes deste estudo.

Aos amigos do setor de patologia pelo convívio diário, tornando a rotina um pouco mais descontraída.

Ao amigo Bruno e as Tias Dodora e “Jaran” que nos deixaram durante essa caminhada, mas sempre serão lembrados nos momentos de alegria.

Aos amigos de Rio Doce, Viçosa, BH e do Palmital, por propiciar momentos de descontração.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro

A todos que participaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho.

Meus agradecimentos, Obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC - 3-amino-9-ethylcarbazole
BALT - Tecido linfóide bronco-associado
CY3 – Fluorocromo cianina 3
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*
HE – Hematoxilina-Eosina
IFA -Imunofluorescência
IHQ - Imuno-histoquímica
ISH - Hibridização In Situ
LAMP-PCR - *Loop Mediated Isothermal Amplification-PCR*
μL – Microlitro
μm - Micrômetro
Microvet - Microbiologia Veterinária Especial
ng - nanograma
pb – Pares de base
PBS – Tampão fosfato-salino
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PCV2 – Circovírus suíno Tipo 2
PE - Pneumonia enzoótica
PMWS - Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS)
PRDC - Porcine Respiratory Disease Complex
PRRS – Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos
rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal
SAS - *Statistical Analysis System*
SPF – *Specific Pathogen Free*
VPN - Valor Preditivo Negativo
VPP - Valor Preditivo Positivo
CCU – *Color-changing units*

SUMÁRIO

1-) INTRODUÇÃO	14
2-) REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	16
2.1.1) Etiologia	16
2.1.2) Epidemiologia	16
2.1.3) Patogênese	17
2.1.4) Sinais Clínicos	18
2.1.5) Lesões	18
2.1.6) Diagnóstico.....	19
2.1.6.1) Métodos Diretos	19
2.1.6.2) Métodos Indiretos	19
2.1.7) Tratamento e Controle.....	20
2.2) <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	22
2.2.1) Etiologia	22
2.2.2) Epidemiologia	22
2.2.3) Patogênese	23
2.2.4) Sinais clínicos.....	23
2.2.5) Lesões	23
2.2.6) Diagnóstico.....	24
2.2.7) Tratamento e Controle.....	24
2.3) PCV2 e Vírus da Influenza como imunossupressores.....	25
3) MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1) Amostras.....	26
3.2) PCR-duplex	26
3.3) Histopatologia.....	27

3.4) Hibridização fluorescente <i>in situ</i>	28
3.5) Imuno-histoquímica para <i>M. hyopneumoniae</i>	29
3.6) Imuno-histoquímica para PCV2 e Influenza	29
3.7) Análises Estatísticas	29
4-) RESULTADOS	30
4.1) Idade dos animais	30
4.2) Histopatologia.....	31
4.3) Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) do FISH para <i>M. hyopneumoniae</i>	32
4.4) Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN da Imuno-histoquímica (IHQ) para <i>M. hyopneumoniae</i>	34
4.5) Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN do FISH para <i>M. hyorhinis</i>	35
4.6) Imuno-histoquímica para circovírus (PCV2) e vírus da influenza A.	37
5-) DISCUSSÃO	39
6-) CONCLUSÕES	44
7-) REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais técnicas de diagnóstico para <i>M. hyopneumoniae</i> Erro! Indicador não definido. ⁹	
Tabela 2 - Sequência e especificidade das probes utilizadas no estudo	297
Tabela 3 - Cálculo das variáveis	308
Tabela 4 - Médias da idade dos animais, intensidade das lesões microscópicas nos grupos positivos à PCR para <i>M. hyopneumoniae</i> (grupo 1), para <i>M. hyorhinis</i> (grupo 2) e para ambos (grupo 3), e sensibilidade e especificidade do FISH e da IHQ.	319
Tabela 5 - Resultados do FISH para <i>M. hyopneumoniae</i>	31
Tabela 6 - Resultados da IHQ para <i>M. hyopneumoniae</i>	353
Tabela 7 - Resultados do FISH para <i>M. hyorhinis</i>	364
Tabela 8 - Detecção pela IHQ de agentes virais no grupo 1 (<i>M. hyopneumoniae</i>), grupo 2 (<i>M. hyorhinis</i>) e grupo 3 (co-infecção).....	397

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Pulmão de suíno do Grupo 1 – Hiperplasia de tecido linfóide bronco-associado (BALT) (HE, 200X).....	32
Figura 2 – FISH, <i>M. hyopneumoniae</i> em pulmão de suíno do Grupo 1 (CY3, 400X)..	33
Figura 3 - FISH, <i>M. hyopneumoniae</i> em pulmão de suíno do Grupo 1 (CY3, 1000X).	34
Figura 4 - IHQ, <i>M. hyopneumoniae</i> em pulmão de suíno do grupo 1 (AEC, hematoxilina – 400X).....	35
Figura 5 – FISH, <i>M. hyorhinis</i> em pulmão de suíno do Grupo 2. (CY3, 400X).....	36
Figura 6 - FISH, <i>M. hyorhinis</i> em pulmão de suíno do Grupo 2 (CY3, 1000X).	37
Figura 7 - IHQ, PCV2 em pulmão de suíno do Grupo 2 (AEC, hematoxilina, 200X). 38	
Figura 8 - IHQ, Influenza A em pulmão de suíno do Grupo 2 (AEC, hematoxilina, 200X)	38

Resumo

A pneumonia micoplásmica causada por bactérias do gênero *Mycoplasma* é uma enfermidade de grande importância para indústria suinícola, sendo ainda controverso o papel desempenhado pelo *Mycoplasma hyorhinis* nessa doença. A confirmação da presença dessas bactérias bem como a identificação de seus papéis em doenças respiratórias continua sendo um grande desafio. Os objetivos desse estudo foram comparar diferentes técnicas, em especial a de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), para diagnóstico de micoplasmoses respiratória em suínos naturalmente infectados e avaliar a presença do *M. hyorhinis* em casos precoces de pneumonia micoplásmica. Foram utilizadas 90 amostras de tecido pulmonar infectado para cada um ou ambos os agentes (*M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*) determinados pelo mosaico de diagnóstico (sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas e pela PCR). No grupo de animais positivos pela PCR apenas para *M. hyorhinis* (Grupo 2) a média da idade foi de 57,32 dias e no grupo apenas positivo para *M. hyopneumoniae* (Grupo 1) a média foi de 116,31 dias ($P < 0,01$). Estes achados sugerem que a colonização e o aparecimento de lesões causadas pelo *M. hyorhinis* seja mais precoce do que aquelas causadas pelo *M. hyopneumoniae*. As alterações microscópicas foram estatisticamente ($P < 0,01$) mais intensas no grupo 1 do que no grupo 2. Usando o mosaico de diagnóstico como padrão ouro, a sensibilidade e especificidade na FISH para *M. hyopneumoniae* foi de 75 e 100%, respectivamente, e 40 e 73,3%, na imuno-histoquímica. A sensibilidade e especificidade da FISH para *M. hyorhinis* foi de 76,7 e 100%. Esses valores demonstram que a FISH pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico de micoplasmoses. Foi detectado a presença de agentes virais (PCV2 ou influenza) em 53,3% das amostras do grupo 2 (*M. hyorhinis*) e em 13,3% das amostras do grupo 1 (*M. hyopneumoniae*).

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, imuno-histoquímica, FISH, PCR, pneumonia micoplásmica.

Abstract

Enzootic pneumonia caused by bacteria of the genus *Mycoplasma* is a disease of great importance in the pig industry. Due to the controversial role of *Mycoplasma hyorhinis* in this disease, confirmation of the presence of these bacteria, and the identification of their roles, in respiratory disease remains a major challenge. The objectives of this study were to compare different techniques, especially fluorescent *in situ* hybridization (FISH), for diagnosis of respiratory mycoplasmosis in naturally infected pigs, and to evaluate the presence of *M. hyorhinis* in early cases of mycoplasmal pneumonia. Ninety *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis* infected lung tissue samples were selected based on the mosaic of diagnosis (clinical signs, gross and microscopic lesions and PCR) were used. The average age of animals in group 2 (PCR positive for *M. hyorhinis* only) was 57.32 days and 116.31 days ($P < 0.01$) for group 1 (PCR positive for *M. hyopneumoniae* only). These findings suggest that colonization and development of lesions caused by *M. hyorhinis* occur earlier than those caused by *M. hyopneumoniae*. Microscopic changes were statistically ($P < 0.01$) more intense in group 1 than in group 2. Using the mosaic of diagnosis as the gold standard, the sensitivity and specificity of FISH for *M. hyopneumoniae* was 75 and 100%, respectively, and 40 to 73.3% by immunohistochemistry. The sensitivity and specificity of FISH for *M. hyorhinis* was 76.7 to 100%, respectively. These findings demonstrate that FISH can be a useful tool for diagnosing mycoplasmosis. The presence of viral antigens (PCV2 or influenza A) was detected in 53.3% of the samples in group 2 (*M. hyorhinis*) and 13.3% of the samples in group 1 (*M. hyopneumoniae*).

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, immunohistochemistry, FISH, PCR, mycoplasmal pneumonia.

1-) INTRODUÇÃO

O sistema intensivo de produção utilizado pelas suinoculturas tecnificadas ao buscar maior produtividade, aumenta a exposição dos animais a patógenos diversos, tornando-os mais susceptíveis a doenças. Neste contexto, sobressaem aquelas de origem respiratória, que se constituem numa das principais responsáveis por perdas econômicas devido aos custos com antibióticos, aumento da taxa de mortalidade, diminuição da conversão alimentar e eventual condenação da carcaça ao abate.

Vários são os agentes causadores de pneumonias nos suínos podendo os mesmos atuarem isoladamente ou, quando de forma sinérgica, causar uma síndrome conhecida como complexo de doenças respiratórias dos suínos (PRDC, do inglês *Porcine Respiratory Disease Complex*). Dentre os principais agentes envolvidos nesse complexo destacam-se o *Mycoplasma hyopneumoniae*, o vírus da Influenza A, o Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e o vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRS, do inglês *Porcine Respiratory Reproductive Syndrome*), ainda exótica no Brasil. A contaminação secundária por bactérias de diversos gêneros determinam agravamento do quadro.

Como patógeno respiratório, o *M. hyopneumoniae* possui grande relevância em decorrência da dificuldade de seu

controle e pela sua cinética de infecção. Geralmente, este microrganismo causa uma pneumonia crônica, porém branda, conhecida como pneumonia micoplásmica que, por suas características imunossupressoras, torna o animal mais vulnerável a infecções por outros contaminantes, levando ao quadro de pneumonia enzoótica (PE).

Já o *M. hyorhinis*, incriminado como causador de poliserosite, artrite e otites em suínos, é um habitante saprófita do trato respiratório, eventualmente responsabilizado como causador de pneumonia, apesar de não serem conhecidas as condições que desencadeiam o processo. Estudos recentes têm demonstrado a presença de *M. hyorhinis*, pela PCR, em quantidade crescente de animais ao longo do ciclo de vida, sendo muitos desses animais saudáveis. As lesões pneumônicas observadas são semelhantes àquelas causadas pelo *M. hyopneumoniae*, quais sejam, hiperplasia de tecido linfóide bronco-associado (BALT), infiltrado perivascular e peribronquiolar, e ainda hiperplasia de pneumócito tipo II (Clavijo et al.,2012).

Os suínos são susceptíveis à infecção pelo *M. hyopneumoniae* em qualquer fase da vida, entretanto a alta concentração de anticorpos maternos nos primeiros dias e o longo período de incubação da doença faz com que os sinais clínicos e lesões, de uma forma geral, comecem a aparecer na fase de recria. Nos últimos anos, com o crescente interesse e

maior investigação no diagnóstico do vírus da Influenza A, têm-se observado casos que apresentam lesões semelhantes às pneumonias micoplásmicas em suínos no início da fase de creche em animais positivos para Influenza A. Macroscopicamente, são observadas áreas de consolidação crânio-ventrais e, histologicamente, verifica-se que, além das lesões características causadas pelo vírus da Influenza A, pode ser observada a hiperplasia de BALT que é uma alteração sugestiva de infecção por *Mycoplasma* spp. Com isso, começam a prosperar suspeitas do envolvimento do *M. hyorhinis* em casos precoces de pneumonia micoplásmica. Por outro lado, pouco se conhece a respeito do potencial patogênico deste microrganismo quando em associação com alguns agentes virais, sobretudo com aqueles capazes de causar imunossupressão, incluindo a influenza A e o PCV2. Por este motivo, é lícito supor que o *M. hyorhinis* possa desempenhar um papel relevante na gênese destas alterações, principalmente quando associado a fatores imunossupressores.

A ausência de parede celular é uma característica fenotípica particular, que por si só, poderia justificar as dificuldades no controle dos *Mycoplasmas*. Em decorrência disso, torna-se necessário um monitoramento criterioso e contínuo a fim de prevenir a entrada deste microrganismo nas granjas. A cultura bacteriana com alta especificidade seria o padrão ouro para diagnóstico das micoplasmoses, podendo os patógenos serem isolados das articulações,

membranas serosas, cavidade nasal, mucosa traqueobronquial e de bronquíolos. Entretanto, o crescimento fastidioso e lento do *M. hyopneumoniae* ao se contrapor ao crescimento rápido de outras espécies do mesmo gênero dificulta o seu diagnóstico. Assim sendo, a busca de métodos de diagnóstico com elevada sensibilidade como é o caso da PCR e mais recentemente do LAMP-PCR têm se constituído em uma opção interessante. Alternativamente, outras técnicas podem ser utilizadas como é o caso da imuno-histoquímica e mais recentemente, da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a qual têm a vantagem de localizar o agente no tecido, associando-o com a lesão, porém pouco se conhece sobre sua sensibilidade e especificidade. Já como método indireto, três diferentes técnicas de ELISA estão atualmente disponíveis para detecção de anticorpos anti-*M. hyopneumoniae*, as quais têm demonstrado variações quanto a sua especificidade e sensibilidade na detecção de anticorpos.

A escassez de informações a respeito da eficácia das diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença causada por *Mycoplasma* spp. em suínos, bem como as dispersas anotações enfatizando o papel do *M. hyorhinis* na gênese das patologias pulmonares em suínos, representam uma carência de dados essenciais. Desta forma, pretende-se por meio do presente estudo comparar a sensibilidade e a especificidade de diferentes técnicas de diagnóstico de micoplasmoses respiratória em suínos

naturalmente infectados e avaliar a presença do *M. hyorhinis* em casos precoces de pneumonia micoplásmica.

2-) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) *Mycoplasma hyopneumoniae*

2.1.1) Etiologia

Da classe dos Mollicutes o *M. hyopneumoniae* é o agente causador da pneumonia micoplásmica que, com a contribuição de agentes oportunistas, pode evoluir para uma pneumonia mais grave conhecida como pneumonia enzoótica. As técnicas de tratamento e controle utilizadas contra este agente, na maioria das vezes são ineficazes, presumivelmente por se tratar de bactéria pequena, sem parede celular e flexível (Quinn et al., 2005) O *M. hyopneumoniae* é difícil de ser isolado e cultivado, devido ao seu crescimento lento, e pela possibilidade de contaminação com bactérias do mesmo gênero (Thacker e Minion, 2012) requerendo para tal, meios específicos e suplementados com colesterol e glicose, e ambiente com 5 a 10% de dióxido de carbono (Friis, 1975). Para seu cultivo são necessárias sucessivas passagens em caldo, anterior a inoculação em ágar. Com três dias após a referida inoculação já são visualizadas, sob luz

transmitida, colônias semelhantes a “ovo frito”, com zona central mais densa, devido ao crescimento da bactéria para o interior do ágar. Após dez dias, as colônias podem chegar a 1mm de diâmetro (Maes et al.,1996; Quinn e. al., 2005). As taxas elevadas de insucesso no isolamento e crescimento impossibilita a utilização da bacteriologia na rotina de diagnóstico.

2.1.2) Epidemiologia

Aparentemente, o suíno é a única espécie susceptível a infecção pelo *M. hyopneumoniae*. Vicca e colaboradores (2003) observaram diferença na intensidade de sinais clínicos e, a partir de estudo experimental, classificaram as diferentes cepas como sendo de baixa, moderada e alta virulência. Com a dificuldade de cultivo, Vranckx et al. (2011) por meio de técnica molecular de tipificação das cepas de *M. hyopneumoniae* (MLVA), demonstraram que poderia haver variações pontuais dessas cepas em uma mesma granja ou em um mesmo animal, mas ainda assim, não haveria diferença de grupos. Adicionalmente, Vranckx et al. (2012) concluíram, através de estudo longitudinal, que a resposta imune do hospedeiro não seria capaz de eliminar a cepa infectante. Já Nathues e colaboradores (2011) observaram que diferentes cepas podem estar simultaneamente presentes em um mesmo animal. Portanto, mais estudos são necessários para compreensão da heterogeneidade de cepas em diferentes

rebanhos, regiões e países. Vale ressaltar que a inoculação de cepa com baixa virulência não previne a capacidade de infecção por cepas com alto poder patogênico (Villarreal et al., 2011).

Estudos avaliando a soroprevalência foram realizados em diversos países com a mesma variando de 30 a 80% (Leon et al., 2001; He et al., 2011; Nathues et al., 2013). No cenário nacional, Moreno et al. (1999), em um estudo no qual foram avaliados 2808 soros pelo teste de ELISA, observaram que 27,7% das amostras testadas eram positivas, representando 59,1% das granjas de suínos estudadas.

Em granjas positivas, a via de transmissão mais comum é o contato direto, sendo as porcas importantes disseminadoras do agente para sua leitegada. Porém, apesar da possibilidade da infecção ocorrer logo após o nascimento, os sinais clínicos geralmente são observados mais tardiamente devido ao longo período de incubação do agente (Sibila et al., 2007). Outro ponto que retarda as manifestações dos sinais da doença são as altas concentrações de anticorpos maternos nos leitões nos primeiros dias de vida (Thacker e Minion, 2012). Devem também ser consideradas outras formas de transmissão como os aerossóis, que permitem em condições adequadas, a disseminação do agente por longas distâncias, chegando a mais de 9 km em condições favoráveis (Dee et al., 2009; Otake et al., 2010).

2.1.3) Patogênese

Após a inalação, o *M. hyopneumoniae* supera a barreira mucosa ciliar e as camadas de mucinas que protegem as células do epitélio respiratório. Através de adesinas aderem-se aos cílios levando a cilioestase e, posteriormente, destruição dos mesmos (Debey & Ross, 1994). Apesar de não estar totalmente esclarecida, a forma com que o *M. hyopneumoniae* coloniza o epitélio respiratório, algumas proteínas comprovadamente envolvidas com o processo de adesão em estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido identificadas, dentre elas a P97 (Zhang et al., 1995), a P102 (Seymour et al., 2012) e a P216 (Wilton et al., 2009).

A P97 foi a primeira adesina identificada do *M. hyopneumoniae* que, ao se ligar a receptores dos cílios das células do epitélio respiratório se transforma em importante fator de virulência do agente (Zhang et al., 1995). Outra proteína de grande relevância na patogênese do *M. hyopneumoniae* é a P102, capaz de recrutar plasminogênio e fibronectina à superfície deste microrganismo (Seymour et al., 2012) e, assim procedendo, desempenhar seu importante papel na virulência do agente.

Pouco se conhece sobre as interações do *M. hyopneumoniae* com o sistema imune do hospedeiro. Rodriguez e colaboradores (2004) demonstraram a estimulação de macrófagos alveolares e linfócitos pelo agente, os quais produzem citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelas lesões pulmonares e hiperplasia

linfóide. Este microrganismo tem a capacidade de alterar seus antígenos de superfície permitindo sua colonização por longos períodos (Razin et al., 1998), explicando a cronicidade característica da enfermidade.

Apesar do *M. hyopneumoniae* ser primariamente um patógeno respiratório, sua disseminação por via linfática ou sanguínea tem sido sugerida por estudos que identificaram o agente no fígado, baço e rim de animais experimentalmente inoculados e contactantes (Marois et al., 2007; Woolley et al., 2012). Contudo, essas lesões extra-pulmonares possuem pouca relevância.

2.1.4) Sinais Clínicos

Os principais sinais clínicos observados são tosse não produtiva que varia de intensidade de acordo com o curso e dose infectante, redução da taxa de ganho de peso diário e aumento da conversão alimentar. Quando há o envolvimento de patógenos secundários resulta em febre, anorexia e aumento das taxas de mortalidade. Pelo fato dos sinais serem inespecíficos e requererem frequentemente movimentação dos animais para a sua manifestação, técnicas diagnósticas complementares são necessárias para o diagnóstico definitivo (Sibila et al., 2009).

2.1.5) Lesões

Macroscopicamente as lesões quando agudas consistem em áreas de

consolidação crânio-ventral e edema pulmonar. Com a cronicidade, as alterações circulatórias desaparecem e as porções crânio-ventrais dos pulmões apresentam-se vermelho enegrecidas. Em infecções não complicadas com agentes secundários, apenas pequena porção do pulmão será acometida, caracterizando uma broncopneumonia catarral. Entretanto, com o envolvimento de contaminantes secundários há o agravamento do quadro, com extensas áreas da superfície pulmonar acometidas, com as características variando de acordo com o microrganismo envolvido. Na maioria dos casos há exsudação purulenta (Thacker e Minion, 2012). O grau e a extensão das lesões observadas ao abate estão diretamente relacionados com a faixa etária em que o animal é infectado, sendo mais discretas ou em fase de resolução quando os animais são infectados mais precocemente e, mais intensas ao abate, quando a infecção ocorre mais tardiamente (Simon et al., 1994).

Microscopicamente, infiltrado linfohistiocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular, hiperplasia de pneumócito tipo II e a hiperplasia do tecido linfóide bronco-associado (BALT), caracterizado por unidades estruturais compostas por linfócitos organizados na lâmina basal, são as lesões características das infecções por *M. hyopneumoniae* (Thacker e Minion, 2012). Entretanto, complicações com patógenos secundários também podem alterar as características histológicas das lesões e,

consequentemente, o diagnóstico morfológico.

2.1.6) Diagnóstico

2.1.6.1) Métodos diretos

O cultivo bacteriano é o padrão ouro, entretanto não é utilizado na rotina pelo fato do *M. hyopneumoniae* ter um crescimento extremamente lento e requerer meios com suplementos específicos para o seu metabolismo. Sendo assim, técnicas alternativas são necessárias para detecção do agente. A imuno-histoquímica tem sido utilizada por alguns laboratórios de diagnóstico, entretanto, possui como desvantagens ser realizada como exame *post mortem* e haver reação cruzada com outras bactérias do gênero, em particular com o *M. hyorhinis* (Cheik Saad Bouh, 2003). Por outro lado, tem a vantagem de avaliar a localização do agente e associá-lo às lesões histológicas (Sarradell et al., 2003) Já a imunofluorescência (IFA) necessita de amostras congeladas e equipamentos de processamento específicos e, à semelhança da imuno-histoquímica, o diagnóstico só pode ser realizado após a morte do animal (Piffer e Ross, 1985).

A PCR tem a vantagem de trabalhar amostras *in vivo* e, assim, poder fazer um acompanhamento da cinética de infecção no rebanho. Diversas variantes da PCR têm sido protocoladas. Estudos recentes indicaram os principais sítios de coleta em diferentes faixas etárias em nível de campo

e experimental (Pieters e Rovira, 2013). Neste contexto, os swabs nasais são mais sensíveis no início da infecção, mas, posteriormente, o swab laringeal torna-se a melhor alternativa, visto que o *M. hyopneumoniae* tem como alvo as células ciliadas do epitélio respiratório, principalmente o trato respiratório inferior (Pieters e Rovira, 2013; Prado et al., 2013).

Técnicas histoquímicas como a hibridização *in situ*, marcada com digoxigenina, foram utilizadas para estudos de campo e experimentais (Kwon e Chae, 1999; Kwon et al., 2002). A FISH utiliza uma sonda de oligonucleotídeos conjugada a um fluorocromo, que tem como alvo o gene 16s do rRNA. A utilização desse alvo justifica-se pelo fato de estarem presentes em grandes quantidades em todas as células metabolicamente ativas (Boye et al., 2001). Para técnica de FISH é necessário microscópio de fluorescência para avaliação da marcação.

2.1.6.2) Métodos indiretos

De uma forma geral, a soroconversão em casos de infecção pelo *M. hyopneumoniae* é lenta e detectada mais precocemente 14 dias após de inoculação experimental, podendo, contudo, chegar a nove semanas em condições de campo (Sorensen et al., 1997; Erlandson et al., 2005; Okada et al., 2005). Provavelmente, este período mais longo da soroconversão se deve ao fato do *M. hyopneumoniae* aderir aos cílios do epitélio respiratório e não

invadir o parênquima pulmonar, dificultando a apresentação do antígeno para o sistema imune.

A técnica de ELISA é a mais frequentemente usada para detecção de anticorpos pela sua disponibilidade, custo e facilidade. Os kits comerciais mais utilizados são o ELISA de bloqueio (DAKO Corporation, Carpinteria, California) e dois ELISAs indiretos (Tween 20-ELISA e HerdCheck, IDEXX). Diversos estudos comparados demonstraram variações de sensibilidade e especificidade entre esses kits, sendo o ELISA de bloqueio o que apresenta melhores resultados (Ameri et al., 2005; Erlandson et al., 2005). As principais técnicas para diagnóstico de *M. hyopneumoniae* estão resumidas na tabela 1.

2.1.7) Tratamento e Controle

Após a detecção do *M. hyopneumoniae* na granja, alguns fatores devem ser combinados com o propósito de controlar a disseminação da doença. Macrolídeos e tetraciclina têm sido utilizados para o tratamento de doenças respiratórias (Vicca et al., 2004). As características particulares do agente obrigam a escolha de antibióticos específicos. Como o *M. hyopneumoniae*

não possui parede celular e adere aos cílios das células do epitélio respiratório, torna-se necessário a escolha de antimicrobianos que não utilizam a parede celular como alvo e que alcancem o muco do trato respiratório em altas concentrações. Entretanto, o tratamento é paliativo, resultando em redução dos sinais clínicos e lesões, mas quando interrompido pode haver o agravamento do quadro (Thacker e Minion, 2012).

Sem dúvida a vacinação é a principal forma de controle da micoplasmose. Inúmeras vacinas produzidas a partir da bactéria morta (bacterinas) são comercializadas no mundo, diferindo uma das outras pelo adjuvante utilizado, o que justifica a grande variação de resultados vacinais. Entretanto, há grande variação da eficácia de uma mesma vacina utilizada em diferentes granjas, o que pode ser atribuído a diferentes cepas circulantes, protocolos de vacinação e técnicas de manejo que minimizam ou maximizam a disseminação da doença. Nenhuma vacina é capaz de impedir a colonização do agente, porém ocorre redução dos sinais clínicos e lesões ao abate, além de melhoria dos índices de desempenho quando comparado aos animais não-vacinados (Thacker et al., 1998).

Tabela 1 - Principais técnicas de diagnóstico para *M. hyopneumoniae*

Técnica	Locais	Vantagens	Desvantagens	Referências
PCR	Swab nasal; swab bronquial; macerado de pulmão	<i>Ante mortem</i> Boa sensibilidade e especificidade	Não associado a lesões, detecção de bactérias não viáveis.	Cai et al., 2007 Calsamiglia et al., 1999 Stakenborg et al., 2006
Bacteriologia	Pulmão; Cavidade nasal	<i>Ante mortem</i> , estudo do agente isolado, boa especificidade.	Lento, suplementação do meio, crescimento de contaminantes, não associado a lesões.	Friis, 1975
FISH	Fragmento de pulmão	Associado a lesões, localização do agente, utilização de material fixado, boa especificidade.	<i>Post mortem</i> , pequenas regiões de investigação, não possibilita a caracterização molecular do agente.	Boye et al., 2001
ISH	Fragmento de pulmão	Associado a lesões, localização do agente, utilização de material fixado	<i>Post mortem</i> , pequenas regiões de investigação, não possibilita a caracterização molecular do agente.	Kwon & Chae, 1999
IHQ	Fragmento de pulmão	Associado a lesões, localização do agente, utilização de material fixado	<i>Post mortem</i> , pequenas regiões de investigação, não possibilita a caracterização molecular do agente.	Opriessing et al., 2004
IFA	Fragmento congelado de pulmão	Associado a lesões, localização do agente	<i>Post mortem</i> , pequenas regiões de investigação, não possibilita a caracterização molecular do agente, fragmentação da amostra congelada.	Amanfu et al., 1984
Sorologia (ELISA)	Soro sanguíneo	<i>Ante mortem</i> , estudo de soroprevalência, boa especificidade.	Baixa sensibilidade e reação cruzada	Erlandson et al., 2005

2.2) *Mycoplasma hyorhinis*

2.2.1) Etiologia

Pertencente ao grupo dos Mollicutes, o *M. hyorhinis* é uma bactéria pequena, de vida livre, ovóide ou em forma de cocos, desprovida de parede celular e que apresenta uma membrana com tripla camada que lhe confere certo pleomorfismo (Friis, 1975). À semelhança do *M. hyopneumoniae*, necessita de meios enriquecidos para o seu metabolismo e forma colônias com morfologia semelhante a outros Mycoplasmas. Possui a particularidade de ter crescimento rápido, podendo formar colônias que chegam a 1mm de diâmetro em meio sólido em três dias (Kobisch e Friis, 1996).

2.2.2) Epidemiologia

Apesar de habitante saprófita do trato respiratório é tido como agente causador de poliserosite, artrite e otite em suíno (Kobisch, 2000), sendo pouco conhecido o seu papel como causador de pneumonia. Estudos demonstraram a presença do agente em animais saudáveis e doentes, sendo maior a sua detecção nos animais acometidos quando comparado aos animais hígidos (Rovira, 2009). Em inoculações experimentais, nem todos os

animais desenvolvem pneumonia e quando na presença de lesões as mesmas são discretas (Lin et al., 2006). Em estudo longitudinal, Clavijo e colaboradores (2012) avaliaram pela PCR de swab nasal a dinâmica da colonização pelo *M. hyorhinis* em granjas com histórico de poliserosite. Animais lactentes apresentaram a pequena média de 1,7% de positividade, aumentando para o expressivo percentual de 85% após o desmame. Na tentativa de comprovar o envolvimento do *M. hyorhinis* nos casos de poliserosites, foram eutanasiados animais com sinais clínicos e animais saudáveis. O estudo demonstrou pouca relevância da presença do agente na cavidade nasal, uma vez que dos animais positivos nas amostras de swab nasais, em apenas 60% foi detectado o agente nas serosas (Clavijo et al., 2012).

Além dos suínos, o *M. hyorhinis* tem particular importância em termos de saúde pública pela sua capacidade de infectar células tumorais. A infecção do *M. hyorhinis* em tumores benignos pode causar alterações fenotípicas e da expressão gênica levando a transformação maligna desses tumores, como já demonstrado pela capacidade desse agente infectar células de tumores gástricos e prostáticos (Urbanek et al., 2011; Xu et al., 2013).

2.2.3) Patogênese

Existe uma carência de estudos mais conclusivos sobre a patogênese do *M. hyorhinis*, bem como dos seus fatores de virulências e das condições do hospedeiro que facilitam o desenvolvimento das enfermidades causadas por esse agente. Muito é especulado baseado em resultado de técnicas diretas de diagnóstico que permitem a visualização do agente. Por meio das técnicas de IHQ e FISH foi possível identificar a presença do agente em lesões de serosas (peritônio, pleura, pericárdio), articulações e no ouvido médio (Morita et al., 1993; Boye et al., 2001).

Estudos experimentais demonstraram que fatores imunossupressores tornam a colonização pelo *M. hyorhinis* mais intensa e de caráter mais agudo no trato respiratório e nas serosas. Contrapondo a essa observação, observa-se que em animais mais velhos e imuno competentes é mais frequente o desenvolvimento de artrites (Magnusson et al., 1998). Observações em condições de campo demonstram aumento do diagnóstico de *M. hyorhinis* em casos de co-infecção (PRRSV e PCV2), sugerindo serem os agentes virais os fatores imunossupressores que facilitam a colonização e a disseminação do *M. hyorhinis* no hospedeiro (Kawashima et al., 1996; Kobayashi et al., 1996).

2.2.4) Sinais Clínicos

Os sinais clínicos irão variar de acordo com a forma de apresentação da enfermidade e os sítios de acometimento. Com alguma frequência pode-se observar febre, dispneia, aumento de volume das articulações, tosse, relutância ao andar e diminuição do desenvolvimento corporal (Thacker e Minion, 2012).

2.2.5) Lesões

As alterações macroscópicas irão variar de acordo com o curso da doença. Em casos agudos de poliserosite, há deposição de fibrina na pleura, pericárdio e peritônio e com a evolução da enfermidade áreas de aderência vão se formando (Roberts et al., 1963; Duncan e Ross, 1973). Na fase de terminação, o *M. hyorhinis* tem sido incriminado como um dos agentes causadores de artrites, caracterizada pelo espessamento da membrana e aumento da quantidade do líquido sinovial, enquanto à histologia pode ser observada artrite linfocitária (Barthel et al., 1972).

As lesões pneumônicas têm características macro e microscópicas semelhantes às observadas pelas infecções pelo *M. hyopneumoniae*. Como registro, deve ser salientado que as alterações macroscópicas mais evidentes são áreas de

consolidação crânio-ventral nos pulmões, enquanto o exame histológico revela hiperplasia de BALT, infiltrado linfocitário peri-bronquial e peri-vascular e hiperplasia de pneumócito tipo II. Entretanto, deve ser ressaltado com base em estudos experimentais, que as lesões, quando observadas, são mais discretas (Lin et al., 2006).

2.2.6) Diagnóstico

Os sinais clínicos e lesões macroscópicas nos casos de poliserosites são semelhantes considerando diferentes etiologias. Em vista disso, Kang e colaboradores (2012) desenvolveram a PCR multiplex para diagnóstico diferencial entre *M. hyorhinis*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis*. O isolamento de *M. hyorhinis* é menos laborioso quando comparado ao *M. hyopneumoniae*, porém, não é utilizado com frequência na rotina. Além dessas técnicas, a PCR, ISH e FISH podem ser utilizadas para o diagnóstico dessa espécie (Caron et al., 2000; Boye et al., 2001; Kim et al., 2010) porém, pouco se conhece a cerca da sensibilidade e especificidade das mesmas. Atualmente, não existem testes imunológicos comercialmente disponíveis para *M. hyorhinis* (Clavijo e Rovira, 2013).

As técnicas indiretas disponíveis para o diagnóstico, como a hemaglutinação indireta e ELISA são pouco utilizadas na rotina de laboratórios. Reafirma-se que o *M. hyorhinis*, no homem, tem a capacidade de infectar células neoplásicas podendo determinar transformação maligna dessas. Nesses casos, é utilizada a sorologia (ELISA) para traçar o prognóstico de pacientes com alterações proliferativas prostáticas (Urbanek et al, 2011).

2.2.7) Tratamento e Controle

Pelo fato do *M. hyorhinis* não possuir parede celular, antimicrobianos que atuam interferindo na síntese da mesma são ineficazes, como acontece com outras espécies do gênero. Wu et al. (2000) avaliaram a susceptibilidade de 15 cepas de *M. hyorhinis* frente a 10 antimicrobianos e encontraram melhores resultados com a utilização de Tilosina e Tetraciclina, sendo as cepas altamente resistentes a Eritromicina e Sulfametoxazol/Trimetoprima.

Visto que o *M. hyorhinis* aparentemente necessita de condições ambientais ideais e imunossupressão do hospedeiro para infectá-lo, a melhoria do manejo e das condições sanitárias das granjas são os pontos chaves para o controle do agente.

2.3) PCV2 e Vírus da Influenza A como imunossupressores

O vírus da Influenza A é o agente etiológico da gripe suína, enfermidade respiratória aguda, caracterizada por febre, depressão, perda de apetite, dispneia e tosse. Altamente contagiosa, a morbidade pode chegar próximo a 100% mas, geralmente as taxas de mortalidade são inferiores a 1% (Olsen et al., 2006). O vírus tem distribuição cosmopolita, podendo variar quanto à prevalência dos seus subtipos nas diferentes regiões do globo. Além da gripe suína, o vírus é incriminado com um dos agentes primários responsáveis pela PRDC.

O vírus da Influenza através da hemaglutinina (proteína estrutural) adere às células do epitélio respiratório do hospedeiro, penetra por endocitose e induz a produção de citocinas inflamatórias locais no trato respiratório. Dentre as principais citocinas destacam-se os interferons, fator de necrose tumoral alfa, interleucinas 1, 6 e 12 e várias quimiocinas (Van Reeth et al., 2009; Barbe et al., 2011). Portanto, o vírus da Influenza é capaz de causar lesões diretas no revestimento do sistema respiratório, induzir a lesões no parênquima pulmonar e adicionalmente imunossuprimir o hospedeiro, tornando-o mais susceptível a

infecções respiratórias por agentes oportunistas.

Outro agente primário da PRDC, o PCV2 é o determinante causal de diversas síndromes que acometem suínos, sendo mais importante a síndrome do definhamento pós-desmame (PMWS, do inglês *Post-weaning multisystemic wasting syndrome*) caracterizada por diminuição do ganho de peso, aumento de volume de linfonodos e dispneia (Segales et al., 2005; Grau-Roma et al., 2011).

Tico e colaboradores (2013) demonstraram, através de estudo retrospectivo, que as lesões linfóides sistêmicas induzidas pelo PCV2 têm ação direta no desencadeamento da PRDC, ao contrário de outros relatos (Kim et al., 2003) que no passado, salientavam que as lesões respiratórias desempenhavam papel preponderante na gênese desta síndrome. Atualmente, prevalece a hipótese de que para o desenvolvimento das lesões sistêmicas, o PCV2 deve infectar células do sistema imune, incluindo as células dendríticas (Balmelli et al., 2010) e macrófagos alveolares (Gilpin et al., 2003) provocando alterações fenotípicas e diminuição de suas funções imunológicas. O PCV2 é então carregado para os órgãos linfóides onde irá proliferar, causando depleção linfóide e linfopenia. Devido a baixa carga de detecção do antígeno por

técnicas moleculares (ISH) ou imunológicas (IHQ) nos linfócitos, Shibahara e colaboradores (2000) hipotetizaram que a redução no número dessas células se deva a apoptose induzida pelo agente. Depreende-se, portanto, que tanto o vírus de influenza A quanto o PCV2 podem estar associados a uma condição de predisposição a infecções pelo *M. hyorhinis* e consequentes lesões.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Amostras

Foram selecionadas 90 amostras de tecido pulmonar no período de janeiro de 2011 a julho de 2013, oriundas das principais regiões produtoras de suínos do Brasil (Sul, Sudeste, Centro-Oeste). Os fragmentos de tecidos foram provenientes de animais com sinais clínicos de doença respiratória, lesões macroscópicas e reação positiva pela técnica da PCR-duplex (*M. hyopneumoniae* – *M. hyorhinis*), realizada no Laboratório Microvet- Microbiologia Veterinária Especial, Viçosa-MG. O critério de seleção e inclusão no estudo foi positividade para pelo menos um dos agentes supracitados à PCR e presença de lesões microscópicas sugestivas de micoplasmoses. Baseado na PCR-duplex, foram selecionadas 30 amostras positivas para *M. hyopneumoniae* (Grupo 1), 30

positivas para *M. hyorhinis* (Grupo 2) e 30 positivas para ambos agentes (Grupo 3). Das fichas diagnósticas de todos os animais que participaram do presente estudo foram extraídas informações relativas a procedência, idade e histórico clínico.

3.2) PCR-duplex

O DNA total de fragmentos de pulmão e swab bronquial foi extraído utilizando o método PrepMan (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações propostas pelo fabricante. A concentração do DNA foi analisada através do espectrofotômetro Ultrospec 1100 pro (UV/ visible spectrophotometer Amersham Biosciences, England), utilizando-se uma alíquota de 100µL, para padronizar a concentração de DNA para 2 ng/µL. Para a detecção dos Mycoplasmas foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam a porção 16s do rRNA: 5'-CGGGATGTAGCAATACTTCAG-3' para *M. hyorhinis* e 5'-TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC-3' para *M. hyopneumoniae* e um oligonucleotídeo reverse 5'-AGAGGCATGATTTGACGTC-3', comum a todos os iniciadores presentes na reação. Esses iniciadores amplificam o fragmento de 1129 pares de base (pb) para o *M.*

hyorhinis, 1000 pb para *M. hyopneumoniae* dentro da região codificadora do gene 16S rRNA (Stakenborg et al., 2006). O DNA total foi submetido à PCR utilizando-se um volume final de 25 µL. Com exceção do DNA, todos os reagentes foram reunidos em um mix contendo tampão da PCR 10X, 3mM MgCl₂, 1mM dNTP mix, 1pmol do iniciador senso, 1pmol anti-senso, qsp H₂O milli Q 25 µL e 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen life Technologies, Carlsbad, CA, USA), que foram dispensados em microtubos de 200 µL e misturados lentamente. As reações da PCR foram conduzidas no termociclador PXE 0.2 THERMO (Thermo Electron Corporation) com temperatura inicial de 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 15 segundos a 54.6°C; e 1 minuto a 68°C com extensão de 10 minutos a 72 °C (Stakenborg et al., 2006).

3.3) Histopatologia

Fragmentos de pulmão de regiões adjacentes as amostras utilizadas para a PCR foram fixados em formalina 10% tamponada (pH 7,2), processados rotineiramente para histopatologia e embebidos em parafina. Foram realizadas seis seções de 4µm de espessura de cada fragmento, sendo cinco fixadas em lâminas silanizadas. As seções em lâminas

silanizadas foram utilizadas para reações imuno-histoquímica usando anticorpos contra *M. hyopneumoniae*, vírus da influenza A, PCV2 e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, como descrito à frente. A seção não fixada em lâmina silanizada foi corada pela HE e examinada, por um único patologista sem conhecimento prévio dos grupos aos quais pertenciam as amostras, buscando evidenciar lesões características de micoplasmoses graduando-as de forma semi-quantitativa; sendo zero (0), ausência de lesões; um (1), discreto infiltrado linfocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular difuso e discreta hiperplasia de pneumócito tipo II; dois (2), moderado infiltrado linfocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular difuso, moderada hiperplasia de pneumócito tipo II e discreta hiperplasia de BALT; três (3), intenso infiltrado linfocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular difuso, intensa hiperplasia de pneumócito tipo II e moderada hiperplasia de BALT; e quatro (4), hiperplasia de BALT intensa e difusa (Hansen et al, 2010; modificado). Como mencionado anteriormente, somente amostras PCR positivas para pelo menos um dos agentes (*M. hyopneumoniae* e/ou *M.*

hyorhinis) e que apresentaram no mínimo o grau 1 de lesões histológicas foram incluídas no presente estudo.

3.4) Hibridização fluorescente *in situ*

O procedimento de FISH foi executado de acordo com Boye et al. (2001), utilizando individualmente as sondas listadas na Tabela 2. Os cortes de tecido seccionados em lâminas silanizadas com 4µm de espessura foram desparafinizados por aquecimento em estufa a 65°C, submersos em xilol, hidratados em soluções decrescentes de etanol e água destilada por 5 minutos.

A hibridização foi realizada em câmaras de hibridização¹ com as lâminas montadas em utensílio próprio², e incubadas com 100 ml de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) e 500 ng de sonda, a 37°C por 16 horas. Após esse período, as preparações foram lavadas três vezes com tampão de hibridização pré-aquecido (37°C) e, posteriormente, mais três vezes com a solução de lavagem pré-aquecida (37°C) (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl). As preparações foram finalmente lavadas

com água destilada e secas em estufa a 37°C. Todo o procedimento foi realizado sem a incidência de luz direta. Posteriormente, as preparações foram examinadas em microscópio de fluorescência (Olympus, AX70, Japão) com cubo de filtro para o fluorocromo Cy3, utilizando objetiva de imersão com aumento de 40X e 100X e óleo de imersão para microscopia de fluorescência³.

Como controles positivos para a técnica de FISH, foram utilizados fragmentos de pulmão comprovadamente positivos para *M. hyopneumoniae*, gentilmente cedidas pelo Dr. Nelson Mores da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, e para *M. hyorhinis*, cedidas pelo Dr. Tim Kare Jensen do Danish National Institute, Danish Technical University, Copenhagen, Dinamarca. A marcação foi considerada positiva quando houve a visualização destacada de sinal fluorescente do agente no tecido, e negativa na ausência de sinal relevante.

¹ Coverplate slide rack, Thermo Fisher, cat n° 73310017, Waltham, MA, USA

² Coverplates, Thermo Fisher, cat n° 7211001 7, Waltham, MA, USA.

³ Immersion oil type F IR=1.35, Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA.

Tabela 2 - Sequência e especificidade das probes utilizadas no estudo (Boye et al., 2001)

Agente	Sequência da probe	Alvo	Fluorocromo
<i>M. hyopneumoniae</i>	5' ccg tca aga cta gag cat 3'	16s	Cy3
<i>M. hyorhinitis</i>	5' gct gtg aag ctc ctt tct 3'	16s	Cy3

3.5) Imuno-histoquímica *M.*

hyopneumoniae

A técnica de imuno-histoquímica para *M. hyopneumoniae* foi realizada na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária – EMBRAPA, Concórdia-SC, de acordo com protocolo utilizado por Lorenzo et al. (2006). No exame utilizou-se a técnica da Streptavidina marcada com Peroxidase (Kit LSAB, Dako), recuperação antigênica com microondas e pepsina, e anticorpo primário policlonal contra a proteína P36 do *M. hyopneumoniae*. Para os procedimentos de lavagens foi utilizado PBS com pH 7.2, a revelação com o cromógeno amino-etil-carbazol (AEC) e a contracoloração com Hematoxilina de Meyer.

3.6) Imuno-histoquímica

PCV2 e Influenza

A técnica foi realizada no laboratório de imuno-histoquímica do setor de patologia da Escola de Veterinária da UFMG. À semelhança da técnica anterior, a imuno-histoquímica para PCV2 e vírus da

Influenza A foi realizada utilizando a Streptavidina marcada com Peroxidase (Kit LSAB, Dako). A recuperação antigênica foi com proteinase K e os anticorpos primários foram: policlonal leporino anti-PCV2 (Souza et al., 2008) e monoclonal anti-nucleoproteína do vírus da Influenza A (Vincent et al., 1997). Para os procedimentos de lavagens foi utilizado PBS com pH 7.2, a revelação foi efetuada com o cromógeno AEC e a contracoloração com Hematoxilina de Meyer. Este processamento foi realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG.

3.7) Análises Estatísticas

A sensibilidade (A/A+C), especificidade(D/B+D), valor preditivo positivo (A/A+B) e valor preditivo negativo (D/C+D) foram calculados para as técnicas de FISH para *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinitis* e IHQ para *M. hyopneumoniae* considerando o mosaico diagnóstico descrito a seguir, como padrão ouro (Tabela 3).

O mosaico diagnóstico considerou a amostra positiva a partir dos (i) sinais clínicos respiratórios; (ii) lesões macro e microscópicas típicas de micoplasmose e; (iii) e detecção do agente pela PCR. Foram comparadas as idades dos animais dos grupos 1 e 2 pela comparação de médias pelo Teste t de Student. As lesões

microscópicas dos grupos 1, 2 e 3 foram confrontadas pelo método não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A associação com os agentes virais (PCV2 e Influenza) nos grupos 1, 2 e 3 foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado. As análises foram realizadas utilizando o software statistical analysis system (SAS) versão 9.2.

Tabela 3 - Cálculo das variáveis

		Mosaico Diagnóstico		
		+	-	Total
Teste	+	A	B	A+B
	-	C	D	C+D
	Total	A+C	B+D	

4-) RESULTADOS

4.1) Idade dos animais

As idades dos animais do grupo 1 (positivo para *M. hyopneumoniae*) foram comparadas com as do grupo 2 (positivo para *M. hyorhinis*) para indicar o período em que os animais desenvolviam lesões compatíveis com micoplasmose quando infectados por esses dois agentes. Quatro amostras do Grupo 1 e duas do Grupo 2 não tinham informações sobre a idade. O grupo 3 não foi incluído nessa comparação pelo fato de ser positivo para os dois microrganismos.

A média de idade dos suínos positivos para *M. hyopneumoniae* (grupo 1) foi de 116 dias, variando de 40 dias no animal mais novo a 180 dias no suíno mais velho. Já no grupo de suínos positivos para *M. hyorhinis* (grupo 2) a média de idade foi de 57,3 dias, com amplitude de variação de 28 dias no mais jovem a 110 dias no suíno mais velho (Tabela 4). Os animais infectados pelo *M. hyorhinis* foram significativamente mais jovens ($P < 0,01$) do que os animais infectados pelo *M. hyopneumoniae*.

Tabela 4 - Médias da idade (\bar{X}) dos animais e o desvio padrão (DP), intensidade das lesões microscópicas nos grupos positivos à PCR para *M. hyopneumoniae* (grupo 1), para *M. hyorhinitis* (grupo 2) e para ambos (grupo 3), sensibilidade e especificidade do FISH e da IHQ.

	Idade ($\bar{X} \pm DP$)	Intensidade lesões	Sensib./Especif. FISH	Sensib./Especif. IHQ
Grupo 1	116,31 \pm 6,14 ^A	2,37 \pm 0,17 ^A	83%/100%	46,7%/NA ^a
Grupo 2	57,32 \pm 5,92 ^B	1,63 \pm 0,17 ^B	83%/100%	NA ^a /73,3%
Grupo 3	NA	2,17 \pm 0,17 ^{AB}	67,7% ^a - 70% ^b /NA	33,3%/NA

NA: Não aplicável; ^aSensibilidade para *M. hyopneumoniae*; ^bSensibilidade para *M. hyorhinitis*. Letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna indica diferença estatística significativa para P<0.05.

4.2) Histopatologia

As lesões provocadas por bactérias do gênero *Mycoplasma* foram caracterizadas por infiltrado linfocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular, hiperplasia de pneumócito tipo II e hiperplasia de BALT (Figura 1), observadas em diferentes graus de intensidade nos animais do estudo. As alterações foram semi-quantificadas onde todos os grupos tiveram lesões variando de grau 1 (discreto) ao grau 4 (intenso). No

grupo 1 que corresponde as amostras positivas para *M. hyopneumoniae* a média da intensidade das lesões foi de 2,37. Já no grupo 2 com amostras positivas para *M. hyorhinitis* a média das lesões foi de 1,63, enquanto o grupo 3 (coinfecção) teve uma média de 2,23 (Tabela 4). Foi observada a existência de diferença estatística entre os grupos 1 (*M. hyopneumoniae*) e 2 (*M. hyorhinitis*).

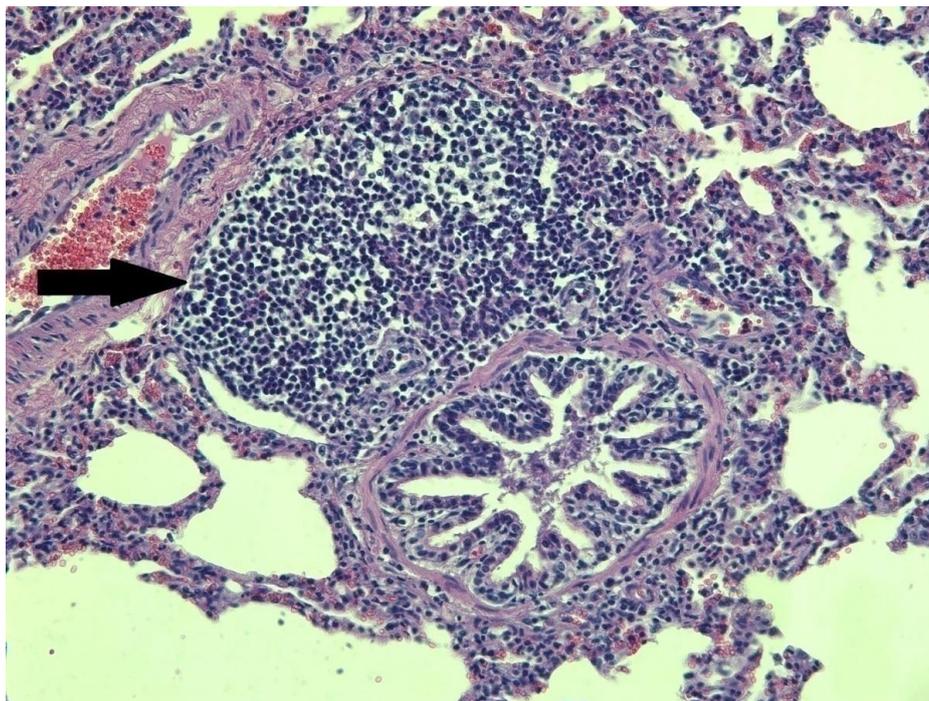


Figura 1 –Pulmão de suíno do Grupo 1 – Hiperplasia de tecido linfóide bronco-associado (BALT) (seta) adjacente ao bronquíolo e discreto infiltrado perivascular e peribronquiolar (HE, 200X).

4.3) Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do FISH para *M. hyopneumoniae*

As amostras foram consideradas positivas quando observada a emissão de fluorescência sob forma de pequenos grânulos, com distribuição linear na superfície do epitélio de brônquios e bronquíolos, e difusamente no exsudato presente na luz das vias aéreas (Figuras 2 e 3). Grânulos maiores e mais grosseiros, correspondendo a autofluorescência do tecido foram observados na lâmina própria

(Figura 2). Quarenta e cinco amostras foram positivas para *M. hyopneumoniae* pela técnica de FISH das 60 positivas para este agente no mosaico de diagnóstico (grupos 1 e 3), com sensibilidade de 75% (45/60). Nas 30 amostras negativas do mosaico diagnóstico (grupo 2) não foi visualizado sinal de fluorescência pela aludida técnica para *M. hyopneumoniae* em nenhuma das amostras (Tabela 5), permitindo concluir que a mesma foi altamente (30/30) específica (100%). O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 100% (45/45) o que equivale a dizer que todas as amostras positivas pela FISH são verdadeiramente positivas quando considerado o mosaico diagnóstico. Já o

Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 66,6% (30/45) demonstrando que do total de amostras negativas na FISH, um terço foram falso negativas quando considerado o mosaico de diagnóstico. Nos casos em que havia a co-infecção (grupo 3) pela PCR, os

casos positivos foram menos diagnosticados, 66,6% (20/30), quando comparados ao grupo 1 que apresentou 83,3% (25/30) de positividade pela técnica de FISH (Tabela 4).

Tabela 5 - Resultados do FISH para *M. hyopneumoniae*.

		Mosaico Diagnóstico		
		+	-	Total
FISH	+	45	0	45
	-	15	30	45
	Total	60	30	

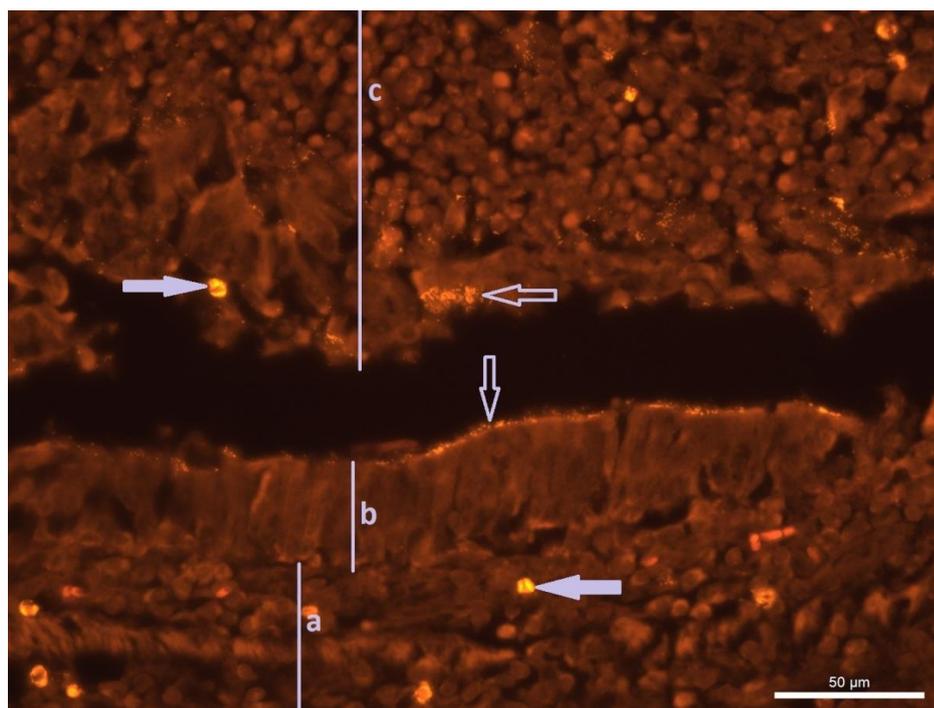


Figura 2 - FISH de *M. hyopneumoniae* em pulmão de suíno do Grupo 1 - Brônquio: Lâmina própria (a), epitélio respiratório (b) e lúmen bronquial (c) com maior intensidade de fluorescência na superfície epitelial (seta vertical) e no exsudato presente no lúmen bronquial (seta horizontal). Estruturas arredondadas na lamina própria e exsudato emitem autofluorescência (setas sólidas) (CY3, 400X).

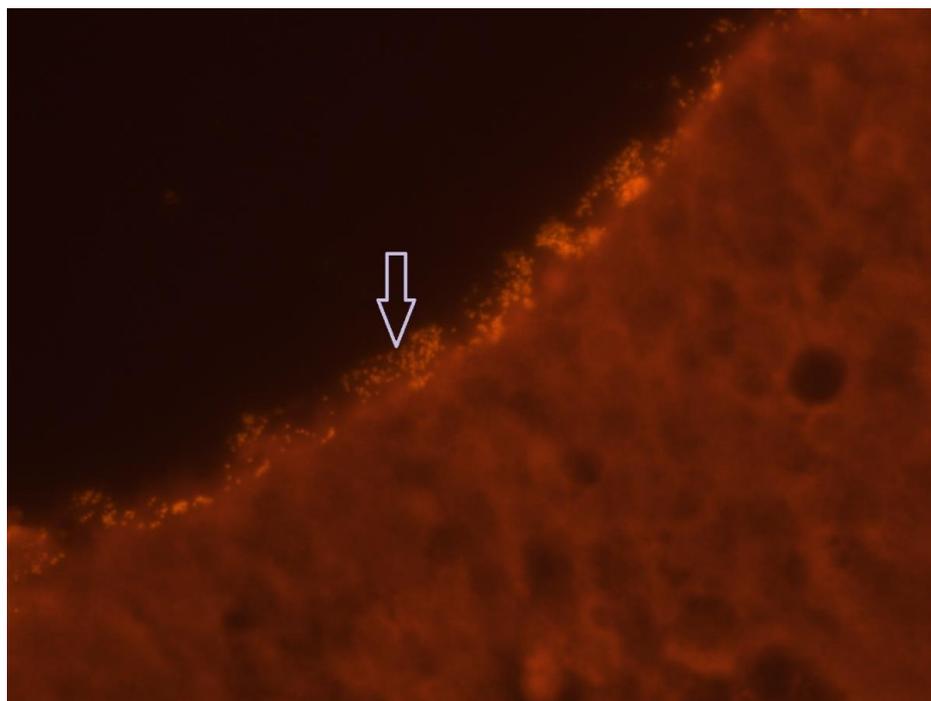


Figura 3 - FISH, *M. hyopneumoniae* em pulmão de suíno do Grupo 1- Brônquio: Grânulos fluorescentes na superfície epitelial (seta) (CY3, 1000X).

4.4) Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da Imuno-histoquímica (IHQ) para *M. hyopneumoniae*

A imunomarcção positiva evidenciada pela técnica de IHQ foi observada na superfície do epitélio respiratório (Figura 4) e no exsudato localizado no interior das vias aéreas. Comparando ao mosaico de diagnóstico, a técnica de IHQ teve sensibilidade de 40%, uma vez que dos 60 animais positivos para *M. hyopneumoniae* (grupos 1 e 3) pela

técnica da PCR, 24 revelaram imunomarcção. A especificidade da técnica foi mensurada a partir da análise das amostras do grupo 2 (positivos para *M. hyorhinis*) resultando num percentual de 73,3% o que corresponde a ausência de imunomarcção em 22 das 30 amostras analisadas. O VPP foi de 75% (24/32) e o VPN foi de 37,9% (Tabela 6).

Quando a sensibilidade da técnica de IHQ foi avaliada separadamente nos grupos 1 e 3, resultou em percentuais de 46,7% e 33,3%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 6 - Resultados da IHQ para *M. hyopneumoniae*.

		Mosaico Diagnóstico		
IHQ		+	-	Total
	+	24	8	32
	-	36	22	58
	Total	60	30	

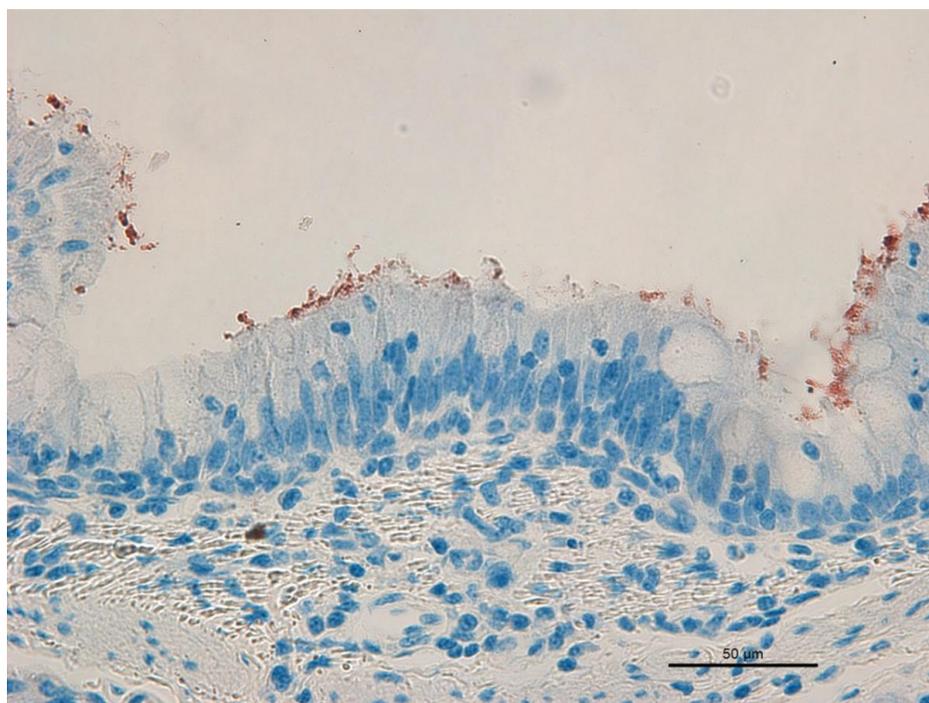


Figura 4 - IHQ, *M. hyopneumoniae* em pulmão de suíno do grupo 1- Brônquio: Imunomarcção vermelha na superfície do epitélio respiratório (AEC, hematoxilina – 400X).

4.5) Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do FISH para *M. hyorhinis*

As características da fluorescência emitida pelo *M. hyorhinis* foram semelhantes às emitidas pelo *M. hyopneumoniae*, entretanto era escassa a quantidade destas bactérias aderidas ao

epitélio dos brônquios e dos bronquíolos sendo detectada em maior quantidade no exsudato das vias aéreas (Figuras 5 e 6). Os valores preditivos da técnica de FISH encontrados para *M. hyorhinis* foram semelhantes àqueles do *M. hyopneumoniae* (Tabela 7), com sensibilidade de 76,7% (46/60), especificidade de 100% (30/30), VPP de 100% (46/46) e VPN de 68,18%

(30/44). Similarmente ao que ocorreu com a FISH para *M. hyopneumoniae*, nas amostras portadoras de ambos os agentes pela PCR (grupo 3) a técnica de FISH teve

sensibilidade menor 70% (21/30) quando comparadas ao grupo 2 que apresentou 83,3% (25/30) (Tabela 4).

Tabela 7 - Resultados do FISH para *M. hyorhinis*.

		Mosaico Diagnóstico		
FISH		+	-	Total
	+	46	0	46
	-	14	30	44
	Total	60	30	

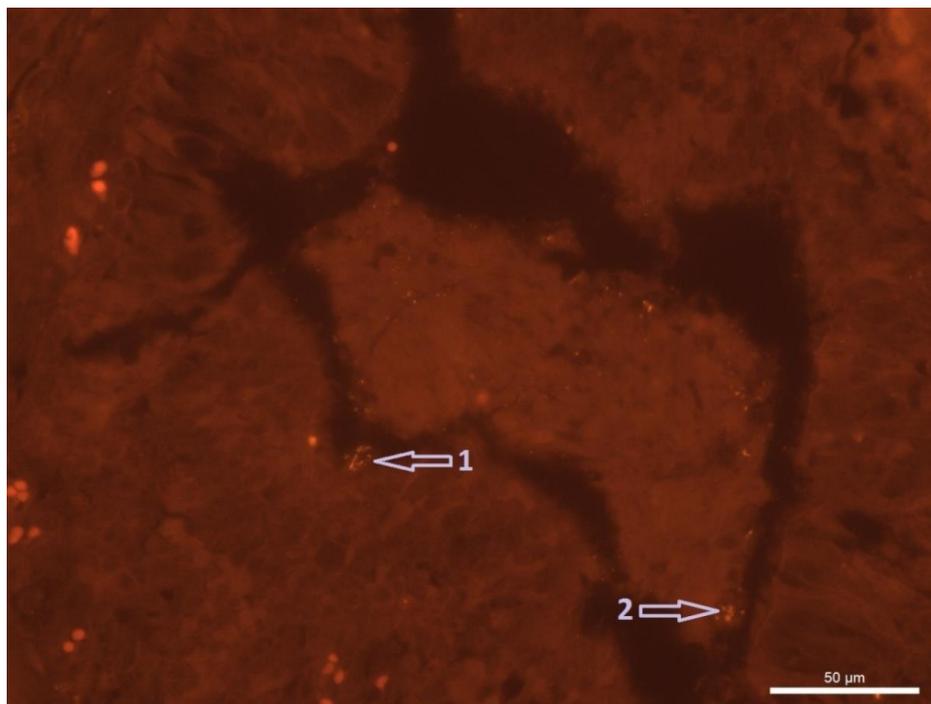


Figura 5 - FISH *M. hyorhinis* em pulmão de suíno do Grupo 2. Bronquíolo: Estruturas granulares fluorescentes formando pequenas colônias aderidas ao epitélio (seta 1) e estruturas granulares no exsudato do lúmen (seta 2) (CY3, 400X).

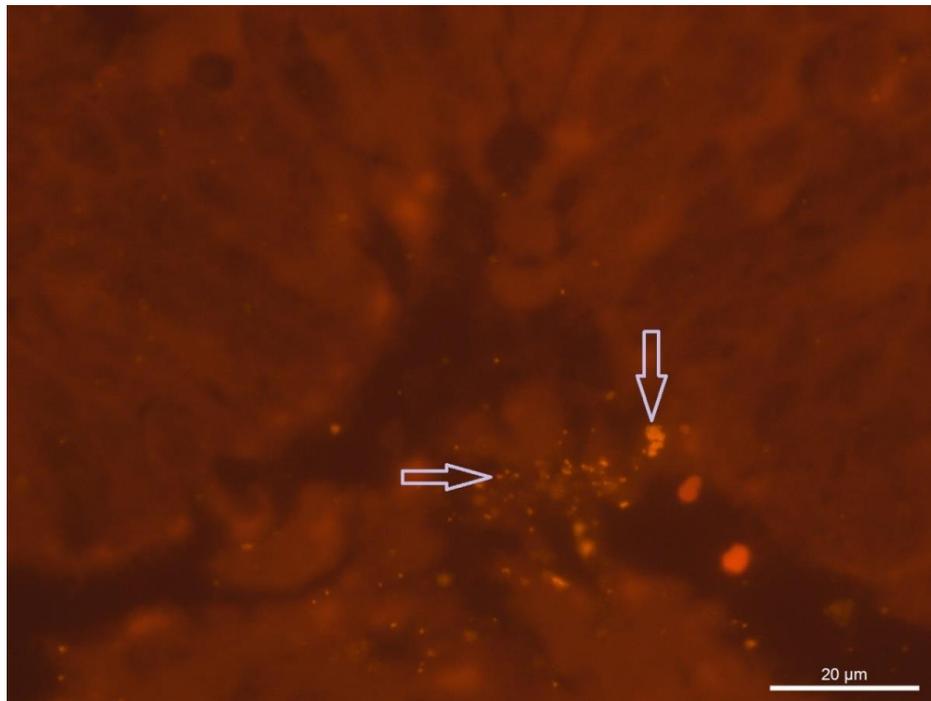


Figura 6 - FISH, *M. hyorhinis* em pulmão de suíno do Grupo 2- Bronquíolo: Grânulos fluorescentes organizados em colônias na superfície do epitélio e no exsudato do lúmen (setas) (CY3, 1000X).

4.6) Imuno-histoquímica para Circovírus e vírus da Influenza A.

Todas as amostras dos três grupos foram testadas pela IHQ para o PCV2 e para o vírus da Influenza. As amostras positivas para o PCV2 apresentaram imunomarcção no citoplasma e na membrana nuclear de histiócitos (Figura 7), principalmente nas regiões peri-bronquial e peri-bronquiolar. Já as imunomarcções para o vírus da Influenza A se localizaram

no citoplasma das células do epitélio de brônquios e bronquíolos e das glândulas bronquiais (Figura 8). No grupo 1, quatro (13,3%) amostras revelaram imunoreação para o vírus da Influenza A e nenhuma foi positiva para o PCV2. O grupo 2 teve 14 (46,67%) amostras positivas para o vírus da influenza A e seis (20%) positivas para o PCV2, sendo 16 (53,3%) positivas para pelo menos um dos agentes virais (Tabela 8). No Grupo 3 não houve detecção para o PCV2 enquanto 10 (33,3%) amostras foram positivas para o vírus da influenza A.

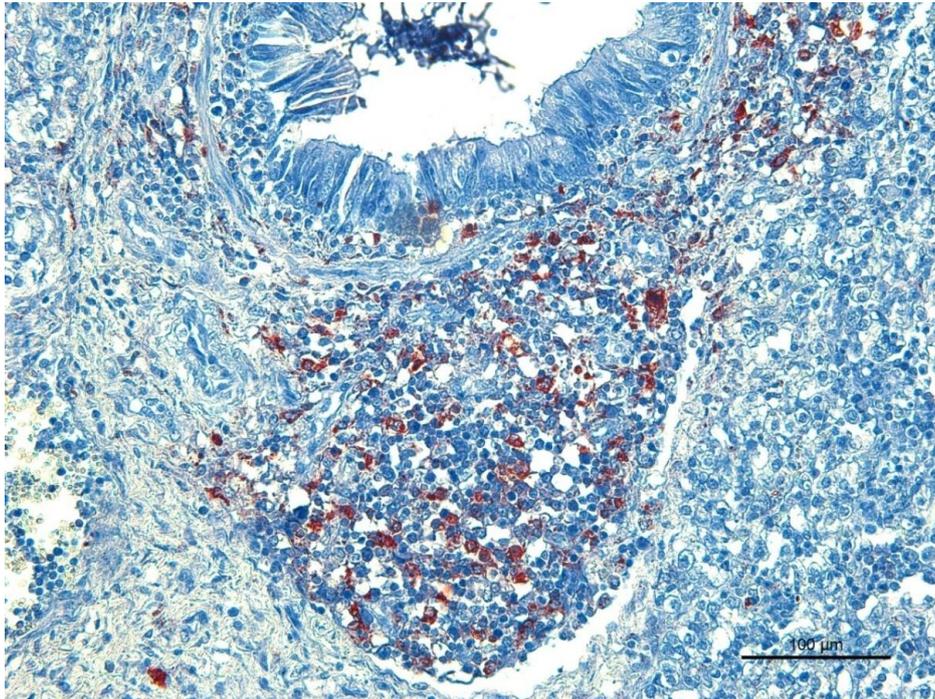


Figura 7 - IHQ, PCV2 em pulmão de suíno do Grupo 2 – Bronquíolo – Imunomarcção de cor vermelha no citoplasma e núcleo de macrófagos (AEC, hematoxilina, 200X).

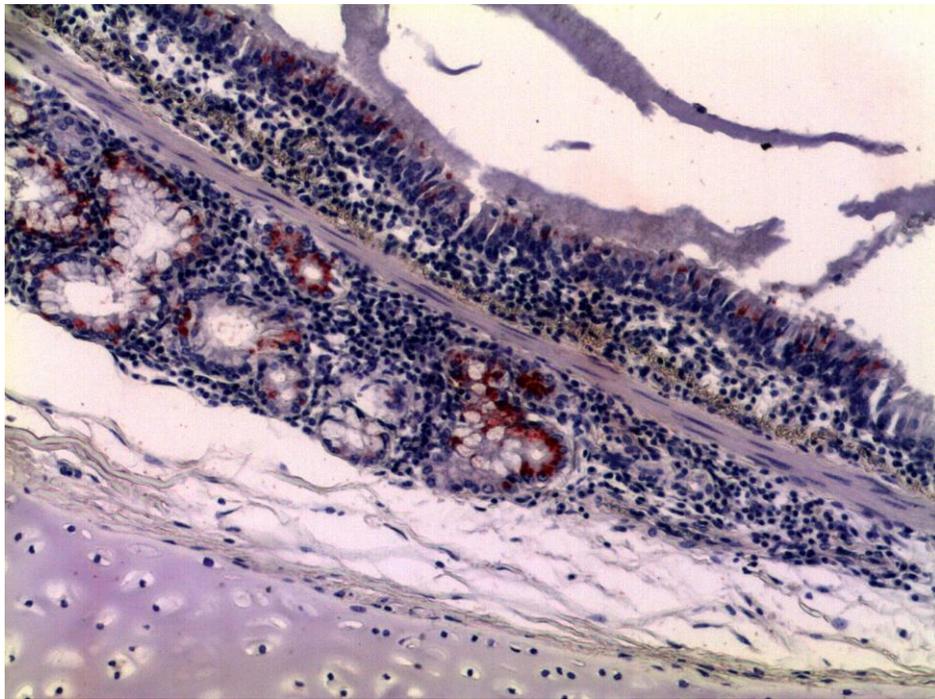


Figura 8 - IHQ, Influenza A em pulmão de suíno do Grupo 2 – Brônquio: Imunomarcção de cor vermelha no citoplasma das células epiteliais e das glândulas bronquiais (AEC, hematoxilina, 200X).

Tabela 8 - Detecção pela IHQ de agentes virais no grupo 1 (*M. hyopneumoniae*), grupo 2 (*M. hyorhinitis*) e grupo 3 (co-infecção).

	PCV2 (+)	Influenza A (+)	PCV2 ou Influenza A (+)
Grupo 1	0/30 ^a	4/30 ^a	4/30 ^a
Grupo 2	6/30 ^b	14/30 ^b	16/30 ^b
Grupo 3	0/30 ^a	10/30 ^{ab}	10/30 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de qui-quadrado ($P < 0.05$).

5-) Discussão

Verificou-se no presente trabalho que a média de idade dos animais acometidos com *M. hyorhinitis* (grupo 2) foi estatisticamente menor que os animais infectados com o *M. hyopneumoniae* (grupo 1). É sabido que, apesar do suíno ser susceptível em qualquer idade, a infecção por *M. hyopneumoniae* ocorre com maior frequência na fase de creche e, devido ao seu longo período de incubação, os sinais clínicos e lesões aparecem mais tardiamente, ou seja, nas fases de recria e, ou terminação. Estudos experimentais (Sorensen et al., 1997; Deblanc et al., 2013) assinalam início dos sinais clínicos uma semana após a inoculação, alcançando a maior severidade após o 20º dia. Deve ser registrado que nesses estudos foram utilizadas cepas de alta patogenicidade isoladas à partir de surtos de pneumonia enzoótica, possuindo o inóculo a concentração de 10^9 CCU/ml. Contribuiu ainda para a rápida manifestação da doença a utilização de animais SPF o que propiciou

a colonização e proliferação mais intensa das bactérias quando comparados a animais com anticorpos maternos remanescentes.

Ao contrário, outros agentes primários da PRDC, como o vírus da Influenza A, tem período de incubação significativamente mais curto. Detmer e colaboradores (2013) observaram o aparecimento de manifestações clínicas com menos de 24 horas após a inoculação experimental com esse vírus. Além disso, Loeffen et al. (2003) observaram a incapacidade dos animais que recebem anticorpos maternos contra o vírus da Influenza de controlar a infecção. Porém esse cenário ainda é controverso, pois Corzo e colaboradores (2012) demonstraram que anticorpos maternos proveniente de cepas homólogas às infectantes são capazes de reduzir a carga de eliminação do vírus e os sinais clínicos da leitegada. Registraram também que esses benefícios não foram observados quando os leitões foram desafiados com cepas heterólogas aos anticorpos maternos. Outros fatores imunossupressores

infecciosos, a citar o PCV2 e o vírus da PRRS, também acometem animais mais jovens. Para Clavijo et al. (2012), a dinâmica de infecção pelo *M. hyorhinis* demonstra aumento da prevalência do agente após o desmame o que facilita a colonização e disseminação em animais imunossuprimidos. Pelo exposto, depreende-se que a ação de fatores imunossupressores no início da fase de creche pode contribuir para a infecção pelo *M. hyorhinis*. Adicionalmente, deve ser registrada a semelhança entre as lesões morfológicas induzidas pelos *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* devendo este último ser considerado na gênese da pneumonia micoplásmica.

Reforçando essa hipótese, o presente estudo demonstrou a existência de correlação entre animais portadores de *M. hyorhinis* (grupo 2) e positividade para vírus da Influenza A e/ou PCV2 (Tabela 8). Vale ressaltar que os exames imunohistoquímicos foram realizados em fragmentos de pulmões não sendo esse o melhor sítio para localização do PCV2 e, também, pelo fato de que o curso da infecção pelo vírus da Influenza A é rápido, com isso esses valores podem ter sido subestimados.

A localização do *M. hyorhinis* pela técnica da FISH foi, predominantemente, no exsudato das vias aéreas (Figura 6), o

que permite inferir que esse agente possui menor capacidade de adesão aos cílios do epitélio respiratório quando comparado ao *M. hyopneumoniae*, sendo mais um fator a corroborar com a hipótese de que o *M. hyorhinis* é um microrganismo oportunista. Diversos trabalhos já mostraram a associação do *M. hyorhinis* com outros agentes infecciosos e fatores imunossupressores dentre eles, o stress (Kinne et al., 1991; Kawashima et al., 1996; Kawashima et al., 2007; Kixmoller et al., 2008), o que possibilita ao *M. hyorhinis* colonizar, infectar e se disseminar nesses indivíduos. Reforçando a hipótese de que o *M. hyorhinis* é considerado agente secundário de lesões pneumônicas, estudos experimentais envolvendo esse patógeno raramente demonstraram quadros de pneumonia que, quando ocorreram, foram discretas e acometeram pequena porcentagem dos animais inoculados (Poland et al., 1971; Lin et al., 2006).

Para a detecção do *M. hyopneumoniae*, os sinais de fluorescência foram observados em microrganismos aderidos ao epitélio de brônquios e bronquíolos e no exsudato presente nessas vias aéreas. Neste contexto, um estudo ultraestrutural para identificação do *M. hyopneumoniae* realizado por Blanchard et al. (1992) encontrou as mesmas localizações do presente estudo. Por outro

lado, Doster e Lin (1988) e Kwon e Chae (1999), utilizando a ISH e IHQ, encontraram além das localizações acima citadas também a presença de *M. hyopneumoniae* no interior de macrófagos e de pneumócitos tipo I. Vale registrar que a FISH, por suas características, é capaz de detectar apenas microrganismos viáveis, o que poderia pelo menos em parte, justificar essa diferença de sítios de observações, e sustentar a possibilidade de que a bactéria já estivesse morta no interior de macrófagos e pneumócitos tipo I. Segundo Zhang et al. (1995) a aderência do *M. hyopneumoniae* aos cílios das células do epitélio respiratório seria importante evento inicial envolvido na patogênese desse agente, determinando alterações dessas estruturas e possibilitando a colonização e proliferação local desse microrganismo. Woolley et al. (2012) assinalaram que a disseminação do agente é um achado eventual e de pouca relevância.

Todas as amostras apresentaram alterações histológicas, em diferentes níveis de intensidade, caracterizadas por infiltrado inflamatório composto principalmente por linfócitos adjacentes aos brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos e, em alguns casos, hiperplasia de folículos linfóides. As lesões observadas nos grupos variaram entre os graus discreto e intenso, estando de acordo com aquelas já descritas por outros autores (Poland et al., 1971;

Sorensen et al., 1997; Lin et al., 2006). A média da semi quantificação das lesões histológicas do grupo 1 foram estatisticamente superiores ao grupo 2. Já o grupo 3 não diferiu estatisticamente de nenhum dos dois grupos, indicando que a coexistência dos dois agentes não potencializa ou determina aumento da intensidade das lesões. Segundo Thacker e Minion (2012), cronologicamente, as lesões se iniciam com infiltrado linfocitário, neutrofílico e aumento do número de macrófagos adjacentes aos brônquios e bronquíolos e exsudação serosa no lúmen das vias aéreas. Em estágios mais avançados, a lesão histológica mais marcante da infecção pelo *M. hyopneumoniae* é a hiperplasia do BALT, levando a obliteração do lúmen das vias aéreas e áreas de atelectasia. Vicca et al. (2003), após observarem variações da intensidade de sinais clínicos, verificaram diferenças de patogenicidade entre cepas de *M. hyopneumoniae* e propuseram uma classificação de baixa, média e alta virulência, indicando que as intensidades das lesões também podem variar com as cepas presentes no rebanho e com o tempo de infecção. No que se refere a hiperplasia de BALT, fatores imunológicos podem influenciar a sua morfologia. Neste contexto, Delventhal e colaboradores (1992) demonstraram a partir de inoculação

experimental com *Actinobacillus pleuropneumoniae* que o estímulo antigênico é responsável por alterações do número e morfologia do BALT. Geralmente existe a hiperplasia de BALT nas infecções por *Mycoplasma* embora não seja essa alteração exclusiva dessas bactérias. Para Meisser e Ross (1991) essas manifestações morfológicas poderiam estar relacionadas a uma proteína mitogênica encontrada nas membranas das bactérias do gênero *Mycoplasma*. Lesões semelhantes, embora mais discretas, foram encontradas em estudos experimentais com *M. hyorhinis* (Lin et al., 2006) mas pouco se conhece sobre a real relação do agente aos casos de pneumonia.

M. hyopneumoniae e *M. hyorhinis* são agentes causadores de importantes enfermidades em suínos, responsáveis por diminuição do desempenho e, por conseguinte, perdas econômicas. Visto que o cultivo bacteriológico é um método lento e frustrante para a identificação de bactérias do gênero *Mycoplasma*, a técnica de FISH se vislumbra como uma alternativa promissora, podendo contribuir para o diagnóstico e estudo sobre a patogênese desses agentes por sua espécie-especificidade. Em nosso trabalho, à semelhança ao observado por Boye et al. (2001), a técnica da FISH não apresentou reação cruzada entre as duas espécies de

Mycoplasma estudadas, ausência de falso-positivos, ou seja a mesma se revelou 100% específica.

A técnica de IHQ teve 73,3% de especificidade, com imunomarcagem de oito das 30 amostras do grupo negativo na PCR para *M. hyopneumoniae*, as quais eram positivas na PCR para *M. hyorhinis*. Todas essas oito amostras foram positivas na FISH para *M. hyorhinis*, portanto, possivelmente, ocorreu imunoreação cruzada com *M. hyorhinis* (falso positivos). Em técnicas imunológicas a qualidade do anticorpo se constitui em fator determinante para detecção específica do agente, visto que existe a possibilidade de anticorpos policlonais se ligarem a outras espécies do gênero (Cheik Saad Bouh et al., 2003). Curiosamente, no grupo 3 houve uma taxa de detecção menor pela IHQ (10/30), quando comparado ao grupo 1(14/30), enquanto o grupo 3 teve 93,3% de positividade pela FISH para *M. hyorhinis* ou *M. hyopneumoniae*. Pelo fato de haver reação cruzada era de se esperar uma maior quantidade de imunomarcagem nesse grupo. A baixa sensibilidade da IHQ (40%) quando comparada a FISH (75%) pode ser devido ao alvo utilizado por essas técnicas, enquanto a IHQ usa como alvo a proteína de superfície P36, a FISH possui como alvo o rRNA. No que tange a P36, Stipkovits e colaboradores (1991) observaram a

expressão dessa proteína em todas as amostras de campo testadas. Por outro lado, Assunção e colaboradores (2005) verificaram por meio do *Immunoblotting*, que essa proteína se expressava em aproximadamente 45% das amostras analisadas (8/18). Maiores estudos sobre expressão gênica e heterogeneidade de cepas de *M. hyopneumoniae* são requeridos para verificar a presença da proteína P36 e sua utilização como marcador em exames imunohistoquímicos.

A sensibilidade da técnica de FISH variou de 66,7% a 83,3% para *M. hyopneumoniae* e de 70% a 83,3% para *M. hyorhinis*. A menor sensibilidade foi encontrada quando desmembradas as amostras que eram positivas para os dois agentes na PCR. O fato de o material submetido aos exames ser de natureza distinta (swabs e fragmentos de pulmão) poderia, pelo menos em parte, explicar essa diferença, pois a área de abrangência da FISH é muito menor que da PCR. Sorensen e colaboradores (1997), ao avaliarem técnicas de diagnóstico para *M. hyopneumoniae*, observaram que há diminuição da sensibilidade temporal, com a mesma caindo progressivamente em todas as técnicas de diagnóstico. Esse mesmo estudo, ao considerar os resultados da 2ª e 12ª semana após a infecção, revelou variação da sensibilidade de 100% para

82% quando utilizado o cultivo bacteriano, 100% para 29% com o uso da PCR, 96% para 18% na imunofluorescência e de 100% para 20% na sorologia (ELISA). O efeito cronológico estaria ligado à quantidade do agente na amostra testada significando que com a evolução do processo, menor quantidade de *Mycoplasma* estaria presente, diminuindo as sensibilidades das técnicas (Ross, 1999). A PCR teve otimizada sua sensibilidade com a padronização da Nested-PCR, que é capaz de detectar baixas quantidades do microrganismo. Por outro lado, pode ser um problema por aumento do potencial de contaminação ambiental das amostras (Thacker, 2004).

A FISH, com sensibilidade de 76,7% e especificidade de 100% permite visualizar os agentes viáveis nas lesões o que, além do auxílio no diagnóstico, também pode ser usado como ferramenta para estudo da patogênese do *M. hyorhinis*, visto que a ausência de anticorpos comerciais anti-*M. hyorhinis* limitam estudos de identificação do agente. A localização do microrganismo é importante pelo fato do *M. hyorhinis* ser comensal do trato respiratório dos suínos. Assim, a sua detecção nem sempre implica na causalidade do evento, devendo sempre, ser associada às lesões macroscópicas e microscópicas para uma abordagem correta dos problemas da granja.

6-) Conclusões

Os resultados obtidos a partir do presente estudo permitiram concluir que:

- O FISH demonstrou ser altamente específico e ter boa sensibilidade quando comparado a PCR para o diagnóstico de micoplasmoses respiratórias nos suínos.
- A IHQ para o *M. hyopneumoniae* teve baixa sensibilidade e especificidade com resultados falso-positivos, possivelmente, devido à reação cruzada com o *M. hyorhinis*.
- Os animais positivos para *M. hyorhinis* foram mais jovens quando comparados aos animais infectados pelo *M. hyopneumoniae*.
- As lesões microscópicas, embora semelhantes, foram mais discretas em suínos infectados por *M. hyorhinis* quando comparados aos infectados por *M. hyopneumoniae*.
- A correlação entre os animais positivos para o *M. hyorhinis* e a IHQ positiva para agentes virais (Influenza A e PCV2), reforça a hipótese de que o *M. hyorhinis* é um agente secundário nas lesões pneumônicas em suínos e deve ser considerado no diagnóstico diferencial do *M. hyopneumoniae*.
- A técnica da FISH se constitui numa boa ferramenta para o diagnóstico e estudos da patogênese desses agentes.

7-) Referências

- AMANFU, W.; WENG, C.N.; ROSS, R.F. et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am. J. Vet. Res.* v. 45 p. 1349–1352, 1984.
- AMERI, M. M.; ZHOU M.; HSU W.H. et al. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.17, p. 61–64, 2005.
- ASSUNCAO, P.; DE la FE, C.; RAMIREZ, A.S. et al. Protein and antigenic variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by SDS-PAGE and Immunoblot. *Vet. Res. Commun.* v. 29, p. 563-574, 2005.
- BALMELLI, C.; STEINER, E.; MOULIN, H. et al. Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, v. 132, p.57-65, 2010.
- BARBE, F.; ATANASOVA, K.; VAN REETH, K. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. *Vet. J.*, v.187, n. 1, p. 48-53, 2011.
- BARTHEL C.H.; DUNCAN J.R.; ROSS R.F. Histologic and histochemical characterization of synovial membrane from normal and *Mycoplasma hyorhinis*-infected swine. *Am. J. Vet. Res.*, v. 33, v.12, p.2501-2510, 1972.
- BLANCHARD, B.; VENA, M.M.; CAVALIER, A. et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, v. 30, p. 329– 341, 1992.

- BOYE, M.; JENSEN, T.K.; AHRENS, P. et al. In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *APMIS* v.9, p. 656–64, 2001.
- CAI, H.Y.; DREUMEL, T.; McEWEN, B. et al. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 19 p. 91–95, 2007
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.11, p. 246–251, 1999.
- CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S.. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J. Clin. Microbiol.* v.38, n.4. p.1390-1396, 2000.
- CHEIK SAAD BOUH K.; SHARECK, F.; DEA, S. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.10, p.459–468, 2003.
- CLAVIJO, M. J.; BRUNER, L.; OLSON, S. et al., Dynamics of infection of *Mycoplasma hyorhinis* in two commercial swine herds. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 39, 2012 Minneapolis. Anais... St Paul: Veterinary Outreach Programs/UMN 2012 p. 91-92 .
- CLAVIJO, M.J.; ROVIRA A. Atualização sobre a infecção por *Mycoplasma hyorhinis* em suínos. *Suínos & Cia*, n. 47, p. 26-28, 2013.
- CORZO, C.A.; ALLERSON, M.; GRAMER, M. et al. Detection of Airborne Influenza A Virus in Experimentally Infected Pigs With Maternally Derived Antibodies. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2012 Jul 25, doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01367.x. [Epub ahead of print].
- DEBEY, M.C.; ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Inf. Immun.*, v.62, p.5312–5318, 1994.
- DEBLANC, C.; ROBERT, F. PINARD, T. et al. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. *Vet. Microbiol.*, v. 162, p. 643–651, 2013.
- DEE, S.; OTAKE, S.; OLIVEIRA, S. et al. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.*, v.40, p.39-52, 2009.
- DELVENTHAL, S.; HENSEL, A.; PETZOLDT, K. et al. Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in the pig. *Int. J. Exp. Path.*, v. 73, p. 351-357, 1992.
- DETMER, S.E.; GRAMER, M.R.; KING, V.L. et al. In vivo evaluation of vaccine efficacy against challenge with a contemporary field isolate from the α cluster of H1N1 swine influenza virus. *Can J Vet Res.*, v. 77, n. 1, p. 24-32, 2013.
- DOSTER, A.R.; LIN, B.C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect

- immunoperoxidase method. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49: p. 1719–1721, 1988.
- DUNCAN J.R.; ROSS, R.F.
Experimentally induced *Mycoplasma hyorhinis* arthritis of swine: pathologic response to 26th postinoculation week. *Am. J. Vet. Res.*, v.34, n.3, p.363-366, 1973.
- ERLANDSON K.R.; EVANS R.B.; THACKER B.J. et al. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *JSHAP*. v. 13, n. 4, p. 198-203, 2005.
- FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare*. *Nord. Vet. Med.* v. 27, p. 337-339, 1975.
- GILPIN, D.F.; McCULLOUGH, K.; MEEHAN, et al. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 94, p. 149-161, 2003
- GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.*, v.187, p. 23–32, 2011.
- HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E. et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J. Comp. Pathol.*, v. 143, p. 120-131, 2010.
- HE, Y.; XU, M.J.; ZHOU, D.H. et al. Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical southern China. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 43, p. 695–698, 2011.
- KANG, I.; KIM, D.; HAN, K. et al. Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis. *Can J Vet. Res.*, v. 76, p. 195-200, 2012.
- KAWASHIMA, K.; YAMADA S.; KOBAYASHI, H. et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. *J. Comp. Pathol.*, v. 114, n. 3 p. 315-323, 1996.
- KAWASHIMA K.; KATSUDA K.; TSUNEMITSU H. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.19, n.1, p. 60-68, 2007.
- KIM, B.; LEE, K.; HAN, K. et al. Development of *In Situ* Hybridization for the Detection of *Mycoplasma hyorhinis* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Naturally Infected Pigs with Polyserositis. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 72, n. 9, p. 1225–1227, 2010.
- KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.*, v. 166, n. 3, p. 251–256, 2003.
- KINNE, J.; JOHANNSEN, U.; NEUMANN, R.; et al.. 1991. The pathology and pathogenesis of experimental *Mycoplasma hyorhinis* infection of piglets with and without thermomotoric stress. 1. Pathologico-anatomic, histologic and immunomorphologic study results. *Zentr. Vet. med.*, v. 38, n.4 p. 306-320, 1991.
- KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M. et al. Reduction of PMWS-

- associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*. v. 26, p. 3443-3451, 2008.
- KOBAYASHI, H.; MOROZUMI, T.; MIYAMOTO, C. et al. *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58 n. 2 p. 109-113. 1996.
- KOBISCH M.; FRIIS N.F. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech*. v.15, p.1569–605, 1996
- KOBISCH, M. Mycoplasma diseases in pigs-old diseases still causing trouble. In: Proc. 16th Int. Pig Vet. Soc. Cong. 2000., Melbourne, Australia, p. 434–438.
- KWON, D.; CHAE, C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by *in situ* hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 308–313, 1999.
- KWON, D.; CHOI, C.; CHAE, C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet. Pathol.*, v. 39, p. 584–587, 2002.
- LEON, E.A.; MADEC, F.; TAYLOR, N.M. et al. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet. Microbiol.*, v. 78, p. 331–341, 2001.
- LI, J.; MINION, F.C.; PETERSEN, A.C. et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, n. 4, p. 607-616, 2013.
- LIN, J.H.; CHEN, S.P.; YEH, K.S. et al. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet. Microbiol.*, v.115, p. 111–116, 2006.
- LOEFFEN, W.L.; HEINEN, P.P.; BIANCHI, A.T. et al. Effect of maternally derived antibodies on the clinical signs and immune response in pigs after primary and secondary infection with an influenza H1N1 virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v. 92, p. 23-35, 2003.
- LORENZO, H.; QUESADA, O.; ASSUNÇÃO, P.; et al. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immun. Immunopathol.* v.109, p. 199-207, 2006.
- MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H. et al. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Quart.* v. 18, p. 104–109, 1996.
- MAGNUSSON, U.; WILKIE, B.; MALLARD, B. et al. *Mycoplasma hyorhinis* infection of pigs selectively bred for high and low immune response. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 61, n.1, p. 83-96, 1998.
- MAROIS, C.; LE, C.J.; KOBISCH, M. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.*, v. 120, p. 96–104, 2007.
- MEISSER, S.; ROSS, R.F. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am. J. Vet. Sci.*, v. 52 p. 1497-1502, 1991.
- MORENO, A.; BARBARINI JR., O.; BACCARO, M. Levantamento sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. IX ABRAVES, 1999. *Anais.*, Belo Horizonte, p. 161-162.

- MORITA, T.; MURAKI, Y.; AWAKURA, T. et al. Detection of *Mycoplasma hyorhinis* in porcine eustachitis. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, n. 3, p. 475-477. 1993.
- NATHUES, H.; BEILAGE, E.G.; KREIENBROCK, L. et al. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet. Microbiol.*, v. 152, p. 338-345, 2011.
- NATHUES, H.; DOEHRING, S. WOESTE, H. et al. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning *Acta. Vet. Sc.*, v. 55, p. 44-56, 2013.
- OKADA, M.; ASAI, T; FUTO, S. et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, v. 105, p. 251-259, 2005.
- OLSEN, B.; MUNSTER, V.J.; WALLENSTEN, A. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. v. 312, p. 384-388, 2006.
- OPRIESSING, T.; THACKER, E.; YU, S. et al Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome by dual-infection of conventional pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.*, v. 41, n. 6, p. 624-640, 2004.
- OTAKE, S.; DEE, S.; CORZO, C. et al Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.*, v.145, p. 198-208, 2010.
- PIETERS, M.; ROVIRA, A. Comparison of various sample types for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* In recently infected pigs. In: ALLEN D. LEMAN CONFERENCE, 40, 2013, Minneapolis. *Anais.*..Saint Paul. p. 75-76.
- PIFFER, I.; ROSS, R.F.. Immunofluorescence technique for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine lungs. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 20 p. 877-882, 1985.
- POLAND, J.; EDINGTON, N.; GOIS, M. et al. The production of pneumonia with ou without pleurisy in gnotobiotic piglets with pure cultures of strain TR 32 of *Mycoplasma hyorhinis*. *J. Hyg. Comb.* v.69, p. 145-154, 1971.
- PRADO, C.; ERTL, J.; PAYNE, B. et al. Comparison of two sample types for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected pigs. In: ALLEN D. LEMAN CONFERENCE, 40, 2013, Minneapolis. *Anais.*..Saint Paul. p. 232.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTAER, M.E. et al. *Micoplasmas*. *Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas* p. 193-199, 2005.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p. 1094-1156. 1998
- ROBERTS, E.D.; SWITZER W.P.; RAMSEY F.K.. Pathology of the visceral organs of swine inoculated with *Mycoplasma hyorhinis*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 24, p. 9-18, 1963.
- RODRIGUEZ, F.; RAMIREZ, G.A.; SARRADELL, J. et al. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* v. 130, p.306-312, 2004

- ROSS, R.F.. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. et al (Eds.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, 1999, p. 495–505.
- ROVIRA, A. Review of *Mycoplasma hyorhinis*. In: ALLEN D. LEMAN CONFERENCE, 36, 2009, Minneapolis. Anais.. St Paul. p.87-88.
- SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; RAMIREZ, A.S. et al. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Pathol.*, v. 40, p. 395–404. 2003.
- SEGALES, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 6, n.2, p. 119–142, 2005.
- SEYMOUR, L.M.; JENKINS, C.; DEUTSCHER, A.T., et al. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cell. Microbiol.*, v. 14, p. 81–94. 2012.
- SHIBAHARA, T.; SATO, K.; ISHIKAWA, Y. et al. Porcine Circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62, p. 1125-1131, 2000.
- SIBILA, M.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S. et al. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet. Microbiol.* v. 121, p. 352–356, 2007.
- SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.*, v. 181, p. 221–231, 2009.
- SIMON, X.; SITJAR, M.; NOYES, E. et al. Relationship between lifetime pneumonia lesions, slaughter volumetric and superficial lung lesions and productive parameters in pigs. In: *Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress, 1994 Bangkok, Thailand*. p. 132.
- SORENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.*, v.54, p.23–34, 1997.
- SOUZA, N.N.; LOBATO, Z.I.P.; GUEDES, R.M.C. Estudo retrospectivo de diagnósticos de circovirose suína pela técnica de imunoistoquímica. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, p. 521-525, 2008.
- STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BUTAYE, P. et al. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. *Vet Res Commun.*, v. 30, n. 3, p. 239-47, 2006.
- STIPKOVITS, L.; NICOLET, J.;HALDIMANN, A. et al. Use of antibodies against the P36 protein of *M. hyopneumoniae* for the identification of the *M. hyopneumoniae* strain. *Mol. Cell. Prob.* v. 5, p. 451-457, 1991.
- TICO, G.; SEGALES, J.; MARTINEZ, J. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Vet. Microbiol.*, v. 163, p. 242-247, 2013.
- THACKER, E.L.; THACKER, B.; BOETTCHER, T.B. et al. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *JSHAP.*, v. 6, p. 107–112, 1998.

- THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *An. Health Res. Rev.*, v. 5, n. 2, p. 317-320, 2004.
- THACKER, E. L.; MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J.J; Karriker, L. A.; Ramirez A. et al (Eds.) *Diseases of swine*. 10. Ed Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 2012, p. 779-797.
- URBANEK, C.; GOODISON, S.; CHANG, M. et al. Detection of antibodies directed at *M. hyorhinitis* p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer. *BMC cancer.*, v. 11, p. 233-238 , 2011
- VAN REETH, K.; VAN POUCKE, S.; DE VLEESCHAUWE, A. Pigs and Pandemic Influenza: Myths versus Facts. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE. 36, 2009, Minneapolis. *Anais.*.St. Paul, p. 23-27.
- VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.*, v. 97, p. 177–190, 2003.
- VICCA, J.; STAKENBORG, T.; MAES, D. et al *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 4470–4472, 2004.
- VILLARREAL, I.; MAES, D.; VRANCKX, K.; et al. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*. v. 29, p. 1731–1735, 2011
- VINCENT, L. L.; JANKE, B. H.; PAUL, P. S.; et al. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 9, p.191-195, 1997.
- VRANCKX, K.; MAES, D.; CALUS, D. et al. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis is a suitable tool for the differentiation of *M. hyopneumoniae* strains without cultivation. *J. Clin. Microbiol.*, v.49, p. 2020–2023, 2011.
- VRANCKX, K.; MAES, D. SACRISTAN, R.D.P. et al. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Vet. Microbiol.*, v. 156, p. 315–321, 2012
- WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S.J. et al. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, v. 71, p. 566–582, 2009.
- WOOLLEY, L.K.; FELL, S.; GONSALVES, J.R. et al. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet. Microbiol.* v. 161, p. 186–195, 2012.
- WU, C.C.; SHRYOCK T.R.; LIN T.L. et al. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinitis*. *Vet. Microbiol.*, v. 76, n. 1, p. 25-30, 2000.
- XU, Y.; LI, H.; CHEN, W. et al. *Mycoplasma hyorhinitis* Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Plos one*. v. 8, n. 11, p. e77955, 2013.
- ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* v. 63, p. 1013–1019. 1995.