

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**IMPACTO DE AGENTES BACTERIANOS DO COMPLEXO DE DOENÇAS
RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS (CDRS) NOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS E NO
APROVEITAMENTO DE CARÇAÇA EM SUÍNOS EM FASE DE TERMINAÇÃO**

TALITA BROMBILLA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientadora: Dr^a. Claudia Del Fava

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Brombilla, Talita.

Impacto de agentes bacterianos do complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS) nos índices zootécnicos e no aproveitamento de carcaça em suínos em fase de terminação. / Talita Brombilla. – São Paulo, 2015.

119 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.**
Linha de pesquisa: Gestão sanitária e Ambiental na Produção Animal.

Orientador: Claudia Del Fava.

Versão do título para o inglês: Impact of bacterial agents of porcine respiratory disease complex (PRDC) zootechnical indices and carcass yields of fattening pigs.

1. Suínos 2. Pleuropneumonia 3. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 4.

Diagnóstico diferencial 5. Complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) I. Brombilla, Talita II. Del Fava, Claudia III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2015/004



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO**

Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Talita Brombilla

Título: IMPACTO DE AGENTES BACTERIANOS DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS (CDRS) NOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS E NO APROVEITAMENTO DE CARCAÇA EM SUÍNOS EM FASE DE TERMINAÇÃO

Orientadora: Dr^a.Claudia Del Fava

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

*Deixe todos os campos em branco para serem preenchidos no dia do exame de Defesa da Dissertação.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha amada Mãe e meu eterno Pai.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido essa oportunidade e ter tido paciência, força e iluminação em toda a minha trajetória.

Agradeço a minha amada Mãe Marly, meu exemplo de fortaleza, que sempre me deu apoio, amor, confiança e dedicação, me encorajando em cada fase da minha vida, sendo minha base e referência sempre.

Ao meu querido irmão Tobias, por seu companheirismo e a meu Pai Alcides, que mesmo em outra dimensão, sei que está sempre olhando por mim.

À toda a minha família que com muito orgulho sempre me apoiaram a continuar esse sonho.

À Lurdes e Paulo, minha família em São Paulo, pela acolhida e todo o carinho.

Ao Renato Akio Ogata, uma pessoa mais que especial, por todo o apoio, ajuda, companheirismo, carinho e dedicação que sempre expressou ao meu lado.

A família Ogata, por todo o amor e cuidado.

Agradeço a Dr^a. Claudia Del Fava, pela orientação, auxílio e atenção, e a todos do Laboratório de Anatomia Patológica (LAP).

A Dr^a. Alessandra F. Castro Nassar, pelos ensinamentos e dedicação, bem como todos do Laboratório de Bacteriologia Geral (LBG).

A Dr^a. Maristela Vasconcellos Cardoso (LDBR), pela ajuda e apoio.

A Josete Garcia Bersano e a todos do Laboratório de Doenças de Suínos Washington Sugay (LDSWS), pela ajuda.

A Dr^a. Vera Letticie de A. Ruiz e Andrea M. Moreno por nos disponibilizarem com os controles positivos das reações da PCR.

A Dr^a. Joslaine N. dos S. G. Cyrillo, pela contribuição conosco na análise estatística.

A FZEA-USP Pirassununga por terem aberto as portas para que as colheitas dos materiais pudessem ser realizadas.

A *Idexx*, pelas doações dos kits de ELISA.

A todos os meus amigos e aos amigos e colegas tão queridos da Pós-Graduação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado (processo número: 2013/07964-5).

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado pelo período de três meses.

RESUMO

BROMBILLA, T. - IMPACTO DE AGENTES BACTERIANOS DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS (CDRS) NOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS E NO APROVEITAMENTO DE CARÇA EM SUÍNOS EM FASE DE TERMINAÇÃO. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Instituto Biológico.

A suinocultura vem progredindo em grande escala, com uma maior tecnificação e assim possibilitando uma maior produção com estrutura e mecanismos desenvolvidos. Fatores ambientais, falhas de manejo e alta concentração de animais predisõem o plantel às doenças respiratórias graves que acarretam sérios prejuízos econômicos. Dentre as pneumonias bacterianas de importância, encontra-se a Pleuropneumonia Suína (PPS), doença causada pelo agente *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), acometendo os animais em fase de terminação, reduzindo o ganho de peso e podendo levar a condenação da carcaça dos suínos doentes. É de extrema importância que na ausência de App, seja realizado o diagnóstico diferencial das principais doenças bacterianas respiratórias que pertencem ao Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS): *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus* sp. O presente estudo teve por objetivo diagnosticar do PPS em suínos em fase de terminação por meio de sorologia (ELISA), exame anatomopatológico (macroscopia e microscopia), cultivo microbiológico e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O *M. hyopneumoniae* foi testado por nested PCR, a *P. multocida* e *H. parasuis* por multiplex PCR e o *Streptococcus* sp identificado por cultivo bacteriano. A investigação soropidemiológica para PPS foi realizada em quatro granjas do Estado de São Paulo, totalizando 192 suínos na fase de terminação, sendo 2,09% reagentes. O histopatológico realizado em 135 amostras identificou lesões sugestivas de doença respiratória, como edema intersticial, intenso espessamento da pleura visceral e interlobular, enfisema pulmonar, presença de infiltrado inflamatório mononuclear e neutrófilos. No cultivo microbiológico realizado em 145 amostras não foi isolado o App, porém isolou-se o *Streptococcus* sp em 11,54% pulmões com lesões macroscópicas e microscópicas. Quanto a multiplex PCR para App e agentes diferenciais (*P. multocida* e *H. parasuis*), todas as 115 amostras foram negativas na PCR multiplex para o *A. pleuropneumoniae* quanto para *P. multocida* e *H. parasuis*. Apesar de vacinado contra a Pneumonia enzoótica, o plantel (115 amostras) apresentou elevado índice de positividade na nested PCR (98,26%), demonstrando endemicidade ao *M. hyopneumoniae*, pois a vacina ameniza sinais clínicos, mas não evita a infecção. Realizou-se a análise de variância em 115 amostras considerando a infecção mista por *Streptococcus* sp e *M. hyopneumoniae*, ou

somente *M. hyopneumoniae*, tendo como variáveis zootécnicas: peso no nascimento, ganho de peso do nascimento ao abate, peso do suíno no final da terminação, e peso da carcaça após abate. Quanto à análise de variância para as lesões macroscópicas, o pulmão enfisematoso reduziu o peso ao abate e o peso da carcaça, porém não foi possível para esta amostragem, concluir o efeito destes patógenos nestas variáveis produtivas, sendo necessários estudos experimentais controlados e balanceados quanto ao número de animais positivos e negativos para patógenos, sexo e idade, e não vacinados contra *M. hyopneumoniae*, a fim de verificar a interferência dos patógenos respiratórios de suínos.

Palavras-chave: suínos, pleuropneumonia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, diagnóstico diferencial, Complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS).

ABSTRACT

BROMBILLA, T. IMPACT OF BACTERIAL AGENTS OF PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC) ZOOTECHNICAL INDICES AND CARCASS YIELDS OF FATTENING PIGS. São Paulo. 2015. Dissertation (MSc in Food Security and Health in Agroecosystem) – Instituto Biológico.

The pig industry is progressing on a large scale, with a higher technicization and thus allowing greater production with structure and mechanisms developed. Environmental factors, management fails and high concentration of animals predispose the squad to severe respiratory diseases that may cause serious economic losses. Among bacterial pneumonia importance is the porcine pleuropneumonia (PPS), a disease caused by the agent *Actinobacillus pleuropneumoniae*, affecting animals in fattening pigs, and loss weight, in addition to nullifying the slaughter of these animals at the appropriate time, the condemnation of sick animal carcasses may occur. It is extremely important that in the absence of App, tests for differential diagnosis of main bacterial diseases diagnosis that belongs to the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) be carried out: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus* sp. This study aimed to identify PPS in pigs in the finishing phase by serology (ELISA), pathology (macroscopy and microscopy), Polymerase Chain Reaction (PCR) and microbiological culture. *M. hyopneumoniae* was tested by nested PCR, *P. multocida* and *H. parasuis* by multiplex PCR and *Streptococcus* sp by bacterial culture. The PPS seroepidemiological investigation it was been done in four farms of São Paulo, being analyzed 192 pigs in the finishing phase, with 2.09% seroreactors. Histopathology was been done in 135 samples, and it was found lesions characteristic of respiratory disease such as oedema, severe thickening of the visceral and parietal pleura, pulmonary emphysema, the presence of mononuclear cell infiltration, and neutrophils. In microbiological culture performed on 145 samples, the PPS was not isolated, while were identified *Streptococcus* sp in 11.54% lungs with significant macroscopic and microscopic lesions. All the 115 samples were negative by multiplex PCR for *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* and *H. parasuis*. Despite vaccinated against *M. hyopneumoniae*, the herd presented right rates of positivity in nested PCR (98.26%), showing endemicity, because the vaccine against this pathogen diminish clinical signals, but not avoid infection. A rate of 98.26% samples were positive to *M. hyopneumoniae* nested PCR. The analysis of variance of 115 samples considering the presence or absence of infection to *Streptococcus* sp and *M. hyopneumoniae* in zootechnical performance rates: birth weight, weight gain from birth to slaughter, final weight at termination, and weight of the

carcass after slaughter. And the analysis of variance for gross lesions, the lung emphysema, reduced the slaughter weight and carcass weight, so was not possible. The conclude to effect of these pathogens in these variables, being necessary to develop experimental studies, whith controlled and balanced number of positive and negative animals to pathogens, sex and age, and not vaccinated against *M. hyopneumoniae*, in order to verify the interference of swine respiratory diseases in production.

Keywords: swine, pleuropneumonia, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, differential diagnosis, Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos na sorologia para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, encontrados em suínos de quatro diferentes granjas do Estado de São Paulo – São Paulo, 2015. 51

Tabela 2 - Lesões macroscópicas pulmonares encontradas nos animais da Granja 4 com relação ao isolamento de *Streptococcus* sp e nested PCR para Mhyo - São Paulo, 2015. ... 58

Tabela 3 - Lesões microscópicas pulmonares encontradas nos animais da Granja 4 e isolamento de *Streptococcus* sp e nested PCR para Mhyo – São Paulo, 2015..... 64

Tabela 4 - Total de bactérias encontradas no isolamento bacteriano, de amostras de pulmão e linfonodo de três granjas do Estado de São Paulo - São Paulo, 2015. 65

Tabela 5 - Isolados bacterianos obtidos conforme a granja estudada - São Paulo, 2015..... 66

Tabela 6 - Resumo do quadro de Análise de Variância para animais positivos apenas para Mhyo ou infectados por ambos os agentes (*Streptococcus* sp associado ao Mhyo), segundo as fontes de variação (peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015. 73

Tabela 7 - Resumo do quadro de Análise de Variância para característica de lesões macroscópicas pulmonares de suínos, segundo as fontes de variação (peso do suíno no final de terminação (PF) e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015. 74

Tabela 8 - Resumo do quadro de Análise de Variância para característica de lesões microscópicas pulmonares de suínos, segundo as fontes de variação (peso do suíno no final de terminação (PF), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD) e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015. 74

Tabela 9 - Resumo da média de Análise de Variância para fontes de variação (peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno no final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015..... 75

Tabela 10 - Distribuição dos animais infectados apenas com Mhyo, ou Mhyo associado à *Streptococcus* sp segundo sexo macho ou fêmea – São Paulo, 2015. 75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Granja 1. Colheita de sangue em suíno no início da terminação. 25
- Figura 2 - Animais da Granja 4 (Matadouro). Colheita de sangue no momento da exsanguinação..... 25
- Figura 3 - Colheita dos fragmentos de pulmão e linfonodos mediastínicos no frigorífico 1... 29
- Figura 4 - Estrutura interna do galpão de terminação (Granja 1). 43
- Figura 5 - Alimentação (ração) fornecida aos animais no galpão de terminação (Granja 1). 44
- Figura 6 - Galpões separados na Granja 1. Seta amarela: maternidade isolada da terminação. Seta vermelha: galpão com fábrica de ração e parte da terminação. 44
- Figura 7 - Galpão de terminação com ambiente escuro e com condições sanitárias precárias. Círculos: presença de aves no local (Granja 2). 45
- Figura 8 - Galpão de maternidade e terminação (Granja 2) 46
- Figura 9 - Alimentação disponibilizada aos suínos (batata aquecida). Caldeirão de aquecimento das batatas (Granja 2). 46
- Figura 10 - Alimentação disponibilizada aos suínos (batata aquecida). Seta amarela: local de armazenamento e mistura das batatas. Seta vermelha: Caldeirão de aquecimento das batatas..... 47
- Figura 11 - Animal com sintomatologia clínica de doença respiratória: tosse, dispneia e posição de “cão sentado” no galpão de terminação (Granja 2). 47
- Figura 12 - Parte externa do galpão de terminação e maternidade de suínos com presença de aves no local (Granja 3). 48
- Figura 13 - Fêmea reprodutora em gestação, criada na forma extensiva, objetivando o bem-estar animal (Granja 4). 49

Figura 14 - Baia com vazio sanitário.(Granja 4).	50
Figura 15 - Baia com animais de terminação. (Granja 4).	50
Figura 16 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Carcaça de suíno sem lesão na parede costal.	52
Figura 17 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Pulmão de suíno com aspecto aparentemente normal.	52
Figura 18 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Linfonodo mediastínico de suíno com aspecto aparentemente normal.....	53
Figura 19 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Carcaça de suíno com tecido pulmonar (pleura) aderido a parede costal.	54
Figura 20 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Pulmão de suíno com ausência de pleura, pela aderência na carcaça.	54
Figura 21 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Carcaça de suíno com tecido pulmonar (pleura) aderido a parede costal.	55
Figura 22 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Pulmão de suíno com ausência de fragmentos de pleura, presença de edema e hemorragia.....	55
Figura 23 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Fragmento de pulmão de suíno. Superfície de nódulo pulmonar. Área de necrose tecidual.	56
Figura 24 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Fragmento de pulmão de suíno. Superfície pulmonar marcada pelas costelas.....	56
Figura 25 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Coração de suíno. Pericardite.	57
Figura 26 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Linfonodo mediastíncio de suíno reativo e hemorrágico.....	57

Figura 27 - Suíno. Pulmão normal. Controle negativo. Epitélio bronquiolar íntegro, alvéolos normais, pleura com espessura regular (Granja 3). HE.40x..... 59

Figura 28 - a: Suíno. Pulmão. Focos de granuloma no parênquima (seta vermelha). H.E.40x.
b: Nódulo formado por áreas de necrose, com presença de neutrófilos, infiltrado mononuclear e macrófagos (seta amarela), circundados por cápsula de tecido conjuntivo (seta azul) (Granja 3). HE.40x. Isolamento bacteriano: não foi possível por haver contaminantes. 60

Figura 29 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral (seta vermelha). Infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (seta azul) e no interstício (seta amarela) (Granja 3). HE.40x. Isolamento bacteriano: *Streptococcus* sp 60

Figura 30 - Suíno. Pulmão. Presença de neutrófilos no lúmen dos bronquíolos (seta vermelha) (Granja 3) HE.100x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 61

Figura 31 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral, com infiltrado inflamatório mononuclear (seta vermelha). Edema alveolar (seta amarela) e infiltrado mononuclear intersticial (seta azul) (Granja 3). HE.100x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 61

Figura 32 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral (seta vermelha). Intenso infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (seta azul). Presença de neutrófilos no lúmen dos bronquíolos (seta verde) (Granja 3). HE.25x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 62

Figura 33 - Suíno. Pulmão. Intenso edema alveolar (seta vermelha) e discreto infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (seta azul) (Lote 5/Granja 4). HE.100x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 62

Figura 34 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento e presença de fibrina na pleura interlobular (seta vermelha). Intenso infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (seta azul) Área de macicez pulmonar com edema e fibrina intersticial (seta verde). Áreas de enfisema (seta amarela) (Lote 4/Granja 4). HE.40x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 63

Figura 35 - Suíno. Linfonodo mediastínico. Reação linfoide folicular (seta vermelha) e focos hemorrágicos (seta azul) (Lote 5/ Granja 4). HE.25x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 63

Figura 36 - Suíno. Linfonodo mediastínico. Reação linfoide folicular (seta vermelha) (Granja 3). HE.25x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo). 63

Figura 37 - Suíno. Placa ágar-sangue carneiro, com crescimento de colônias de *Streptococcus* sp isoladas de pulmão e linfonodos mediastínicos (Granja 4). 67

Figura 38 - Suíno. Colônias de *Streptococcus* sp encontrada em amostra de pulmão e linfonodos (Granja 4). Microscópio com objetiva de imersão (100x). 67

Figura 39 – Teste das amostras de campo submetidas a PCR para controle endógeno (β -actina. 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 ao 10- Amostras de campo (Lote 1/Granja 4); 11- Controle positivo (*Mycoplasma hyopneumoniae*); 12- Controle negativo (água ultra-pura) – São Paulo, 2015. 68

Figura 40 - Resultado do teste dos controles positivos utilizando a técnica de multiplex PCR. 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (346 pb); 3- Controle positivo *Haemophilus parasuis* (821 pb); 4- Controle positivo *Pasteurella multocida* (460 pb); 5- Controle negativo – São Paulo, 2015. 69

Figura 41 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de multiplex PCR. 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 até 14- Amostras de campo (Lote 2/Granja 4); 15- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (346 pb); 16- Controle positivo *Haemophilus parasuis* (821 pb); 17- Controle positivo *Pasteurella multocida* (460 pb); 18- Controle negativo – São Paulo, 2015..... 70

Figura 42 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de multiplex PCR. 1 e 19- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 a 18; 20 a 32- Amostras de campo (Lote 4/Granja 4); 33- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 34- Controle positivo *Haemophilus parasuis*; 35- Controle positivo *Pasteurella multocida*; 36- Controle negativo – São Paulo, 2015. 71

Figura 43 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de nested PCR. 1 e 21- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 a 20; 22 a 31- Amostras de campo (Lote 4/Granja 4); 30- Controle positivo *Mycoplasma hyopneumoniae* (352 pb); 31- Controle negativo – São Paulo, 2015. 72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características das granjas de suínos e número de amostras colhidas – São Paulo, 2015.	26
Quadro 2 - Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de anticorpos contra o <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , em diferentes granjas de suínos do Estado de São Paulo – São Paulo, 2015.	27
Quadro 3 - Frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, onde foram realizadas as colheitas de pulmões e linfonodos de diferentes granjas – São Paulo, 2015.	28
Quadro 4 - Granjas, número de amostras (pulmão/linfonodo) colhidas, data da colheita no frigorífico/matadouro e técnicas laboratoriais utilizadas – São Paulo, 2015.	29
Quadro 5 - Amostras relacionadas ao local de processamento e técnica laboratorial utilizada - São Paulo, 2015.	30
Quadro 6 - Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina, modificado de Prophet et al. (1995).	33
Quadro 7 - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido de pulmão e linfonodo de suínos, modificado de Prophet et al. (1995).	34
Quadro 8 - Primers utilizados para a PCR de B-actin (endógeno) em amostras de suínos..	37
Quadro 9 - Componentes e concentrações da PCR para β -actina (endógeno).....	37
Quadro 10 - Processo de amplificação das amostras, com informações das condições de temperatura, tempo e número de ciclos, para a PCR da β -actina.	38
Quadro 11 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para a reação de multiplex PCR, para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> e <i>Haemophilus parasuis</i>	39

Quadro 12 - Componentes da reação de multiplex PCR para detecção dos agentes *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis*. 39

Quadro 13 - Processo de amplificação do material, com informações das condições de temperatura, tempo e número de ciclos. 40

Quadro 14 - Relação dos *primers* utilizados na Nested-PCR para diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

AFIP: *Armed Forces Institute of Pathology* - Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos

BHI: *Brain Heart Infusion*

β -actina: Beta-actina

CETEA-IB: Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxinucleosídeo-trifosfato

DO: Densidade óptica

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

et al.: e colaboradores

FC: Fixação de complemento

GMD: ganho de peso médio diário

°C: Graus Celsius

HCl: ácido clorídrico

HE: Hematoxilina-Eosina

HI: Hemaglutinação indireta

KCl: cloreto de potássio

Kg: quilograma

LAP: Laboratório de Anatomia Patológica

LBG: Laboratório de Bacteriologia Geral

LDSWS: Laboratório de Doenças de Suínos Washington Sugay

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

nm: nanômetro

pb: pares de bases

PCAR: peso da carcaça

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

PCV2: *Porcine Circovirus type 2* – Circovírus Suíno tipo 2

PES: Pneumonia Enzoótica Suína

PF: peso no final da terminação

pH: potencial Hidrogeniônico

Pmol: picomol

PN: peso ao nascimento

PPS: Pleuropneumonia Suína

PRDC: *Porcine Respiratory Disease Complex* – Complexo de Doenças Respiratórias de Suínos

PRRS: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* – Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos

%: por cento

q.s.p: quantidade suficiente para

RTXs: *Repeat in the Structural Toxin*

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

TMB: tetrametilbenzidina

μL: microlitro

μm: micrômetro

μM: micromolar

mM: milimolar

U: unidade

UV: luz ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS (PRDC)	3
2.2 PLEUROPNEUMONIA SUÍNA E DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS	4
2.2.1 PLEUROPNEUMONIA SUÍNA (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>)	4
2.2.2 PNEUMONIA ENZOÓTICA DOS SUÍNOS (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>)	10
2.2.3 PASTEURELOSE PULMONAR (<i>Pasteurella multocida</i>)	13
2.2.4. DOENÇA DE GLASSER (<i>Haemophilus parasuis</i>).....	16
2.2.5. DOENÇA RESPIRATÓRIA CAUSADA POR <i>Streptococcus</i> sp.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. CETEA.....	24
3.2. INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (Questionário associado a sorologia)	24
3.3. AMOSTRAS.....	25
3.3.1. Colheita de sangue de suínos em granjas e frigoríficos/matadouro.....	25
3.3.2. Colheita de pulmões e linfonodos mediastínicos em frigoríficos e matadouro	28
3.3.3. Locais do processamento das amostras	30
3.4. SOROLOGIA (ELISA).....	31
3.4.1. Sorologia para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	31
3.5. ANATOMOPATOLÓGICO	31
3.5.1. Análise macroscópica	31
3.5.2. Corte de pulmões e linfonodos fixados em formol 10% tamponado	32
3.5.3. Desidratação, diafanização e emblocagem em parafina das amostras de pulmões e linfonodos	32
3.5.4. Preparo das lâminas histológicas para coloração por Hematoxilina- Eosina (HE).....	33
3.5.5. Análise microscópica.....	34
3.6. CULTIVO BACTERIANO	35
3.6.1. Amostras.....	35
3.6.2. Processamento das amostras	35

3.7. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	36
3.7.1. Processamento das amostras	36
3.7.2. Extração do DNA	36
3.7.3. Beta actina (β -actina)	36
3.7.4. Multiplex PCR para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> e agentes diferenciais (<i>Haemophilus parasuis</i> e <i>Pasteurella multocida</i>).....	38
3.7.5. Nested PCR para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	40
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4. RESULTADOS	43
4.1. SELEÇÃO DAS GRANJAS	43
4.2. SOROLOGIA	51
4.3. ANATOMOPATOLÓGICO	52
4.3.1. Análise macroscópica	52
4.3.2. Análise microscópica.....	58
4.4. CULTIVO BACTERIANO	65
4.5. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	68
4.5.1. PCR para Beta actina.....	68
4.5.2. Multiplex PCR para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Haemophilus parasuis</i> e <i>Pasteurella multocida</i>	68
4.5.3. Nested PCR para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	72
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5. DISCUSSÃO	76
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. ANEXOS.....	93

1. INTRODUÇÃO

O sistema de produção de suínos nos países industrializados vem mostrando grande evolução, percebendo-se o aumento do confinamento de suínos objetivando uma produção em larga escala. Esse aglomerado de populações suínas confinadas, associados com fatores de manejo, ambiente, fatores nutricionais e de instalações, bem como o estresse e grau de imunidade, coletivamente ampliam muito o risco do surgimento de enfermidades respiratórias, acompanhadas de prejuízos que ocasionam (CHRISTENSEN et al., 1999).

A etiologia dos problemas respiratórios em suínos é complexa, normalmente ocorrendo interação de dois ou mais agentes infecciosos (SORENSEN et al., 2006), podendo ser agentes bacterianos e/ou virais, além de englobar outras condições, como de manejo e ambiente. Dessa forma, surgiu o termo Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC – *Porcine Respiratory Disease Complex*), uma síndrome conhecida mundialmente pela importância que representa para a suinocultura. Dentre os agentes bacterianos responsáveis por essas enfermidades destacam-se o *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* e *Bordetella bronchiseptica*.

O diagnóstico das enfermidades respiratórias está baseado principalmente no exame clínico e laboratorial dos suínos afetados, características epidemiológicas da população de suínos e nas lesões presentes em animais mortos pela infecção, sacrificados para diagnóstico ou análise das lesões observadas ao abate. É importante estabelecer um diagnóstico diferencial, buscando encontrar o agente causal da doença.

É de grande importância que sejam diagnosticados os agentes respiratórios, pois as doenças respiratórias estão entre os problemas de maior relevância econômica na suinocultura moderna, sendo responsáveis por inúmeras perdas diretas e indiretas. Os problemas são claros, ocorrendo piora no ganho de peso diário e na conversão alimentar, aumento na mortalidade, maiores gastos com medicamentos e vacinas e perdas no abate por condenações relacionadas com pneumonias, aderências nas carcaças, pleurites e/ou abscessos (BLAHA et al., 1994). Nos matadouros, as lesões pneumônicas destacam-se como as principais causas de condenação e aproveitamento condicional de carcaças. Aproximadamente 50% de todas as condenações são causadas por pneumonias (DAL BEM, 2008). Esta informação também é afirmada por Alberton; Mores (2008), além de também afirmar que no abate, aproximadamente 50% dos animais apresentam algum tipo de lesão pulmonar.

O controle e prevenção se baseiam principalmente em ação sanitária e ambiental, eliminação dos fatores de risco pertinentes ao surgimento de doenças respiratórias, além do manejo adequado com os animais.

Como base desse trabalho, o conhecimento do impacto produtivo da Pleuropneumonia suína é uma etapa fundamental para justificar o diagnóstico e implantação de ações preventivas contra esta enfermidade nas granjas, pois faltam dados zootécnicos consistentes que permitam visualizar as perdas produtivas em suínos com enfermidades respiratórias.

Portanto, tendo em vista a importância que as doenças respiratórias de suínos representam no desenvolvimento da suinocultura nacional, é de fundamental valia conhecer as principais causas e agentes bacterianos que desencadeiam esse processo. Dessa forma, os objetivos do trabalho foram:

- ✓ Realizar levantamento soroepidemiológico por teste de ELISA em granjas de suínos com suspeita de Pleuropneumonia Suína (*Actinobacillus pleuropneumoniae*).
- ✓ Realizar diagnóstico diferencial direto de agentes bacterianos envolvidos no complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS) ao abate: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* pela PCR, e do *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Streptococcus* sp por cultivo bacteriano.
- ✓ Avaliar o padrão das lesões macroscópicas e microscópicas causadas pelos agentes bacterianos do CDRS em suínos ao abate.
- ✓ Avaliar os índices zootécnicos de animais positivos aos agentes bacterianos causadores do CDRS em suínos de terminação, segundo as variáveis peso ao nascer, peso no final da terminação, ganho de peso médio diário e peso da carcaça.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS (PRDC)

A organização da produção de suínos vem sofrendo intensas mudanças nos últimos anos (KRABBE, 2013). O aumento das populações confinadas, manejo e parâmetros ambientais, como temperatura, umidade e presença de amônia, bem como fatores inerentes ao animal, como imunidade e estresse, contribuíram para o aparecimento de enfermidades respiratórias (CHRISTENSEN et al., 1999).

O Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC) tem sido muito utilizado para referenciar os quadros clínicos causados por infecções mistas com dois ou mais agentes infecciosos, principalmente em suínos nas fases de crescimento e terminação (HANSEN et al., 2010; THAKER, 2001).

Os agentes responsáveis por enfermidades respiratórias podem ser bacterianos, virais, ou ainda parasitários. Dentre os agentes bacterianos, bem como as doenças que ocasionam, encontra-se o *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente da Pneumonia Enzoótica dos Suínos; a *Pasteurella multocida* responsável por pleurites e juntamente com a *Bordetella bronchiseptica*, causam a Rinite Atrófica; o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente causador da Pleuropneumonia Suína, o *Haemophilus parasuis*, agente da Doença de Glasser e o *Streptococcus suis*, responsável por causar pneumonia e pleurites. Quanto aos agentes virais, tem-se como destaque o Circovírus suíno 2 (*Porcine Circovirus 2 - PCV2*), vírus da Influenza suína e vírus da PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome – Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos*), a qual é exótica no Brasil (HANSEN et al., 2010). A infecção primária por determinados agentes compromete a saúde pulmonar dos animais, levando a infecções bacterianas secundárias importantes, que culminam no agravamento do quadro (PIJOAN, 2006; SOBESTIANSKY et al., 2007; WELLENBERG et al., 2010). No caso de agentes parasitários, podem ser encontrados o *Ascaris suum* e *Metastrongilus* spp (YAGUE, 2012).

Exemplo disso é a infecção pelo PCV2, a qual apresenta forte associação com patógenos bacterianos como *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida* (OPRIESSNIG et al., 2007; ZANELLA et al., 2007). Outro exemplo é o vírus da gripe suína, agente que sozinho causa doença respiratória benigna, porém quando associado ao *Actinobacillus pleuropneumoniae* e/ou *Pasteurella multocida*, a doença pode ser bem mais grave (SOBESTIANSKY et al., 1999). Sendo assim, a severidade da pneumonia aumenta com um maior número de agentes envolvidos.

Além do quadro clínico de enfermidade respiratória, pode-se encontrar pericardite, sendo que geralmente fazem parte desse quadro, doenças específicas como a doença de Glasser, Pleuropneumonia Suína, a Pasteurelose, infecções por *Streptococcus* sp e alguns Micoplasmas (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Conforme Opriessnig et al. (2011), os agentes infecciosos causadores de doença respiratória em suínos podem ser divididos em patógenos primários, capazes de causar lesões respiratórias severas devido a sua própria virulência, e patógenos secundários ou oportunistas, os quais necessitam de ajuda de outros agentes infecciosos ou cofatores para induzirem lesões respiratórias significativas.

Dessa forma, as desordens respiratórias constituem um dos problemas mais importantes na suinocultura moderna, pelas perdas econômicas decorrentes de mortalidade, animais que se tornam refugos e condenação de carcaças (PALADINO, 2012).

Tendo em vista que o impacto das condenações de carcaças é significativamente incidente nos custos de produção, cada vez mais os sanitaristas têm aplicado os conhecimentos gerados nestas pesquisas para realizar um diagnóstico diferencial das lesões pulmonares, procurando correlacionar as lesões com o agente causal (DAL BEM, 2008). Portanto, é importante que estudos sejam realizados nessa área, visando um aprimoramento e soluções para os problemas encontrados.

2.2 PLEUROPNEUMONIA SUÍNA E DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS

Segundo Stark (2000), os fatores determinantes das doenças respiratórias suínas são geralmente infecciosos, sendo que o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, juntamente com *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis*, podem desencadear doença respiratória geralmente iniciada pelo agente *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2.2.1 PLEUROPNEUMONIA SUÍNA (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)

Definição e etiopatogenia

Dentre as pneumonias bacterianas, a Pleuropneumonia Suína (PPS) é uma das mais importantes em todo o mundo (MORENO et al., 1999), sendo uma doença infectocontagiosa que causa lesões graves no pulmão e na pleura (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A etiologia da doença é frequentemente complexa, com interações entre outros patógenos (bactérias oportunistas e vírus) e fatores ambientais, como mudanças bruscas de temperatura, alta umidade relativa do ar e transporte de animais, resultando em supressão das defesas do pulmão e predispondo à aquisição e disseminação da infecção. Em alguns casos isto pode levar a morte, enquanto em outros, a doença pode regredir durante a vida, tendo um significativo efeito negativo no desempenho do animal.

A PPS é uma doença causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), agente etiológico gram-negativo, pleomórfico, imóvel, não esporulado e capsulado (NICOLET, 1992). O App é um patógeno bacteriano específico de suínos, possivelmente pela capacidade de obter ferro apenas da transferrina suína (INZANA, 1991). Esta espécie pode ser dividida em dois grupos, com base na exigência de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para a sua multiplicação: o biotipo 1, que é NAD-dependente e o biotipo 2, que não necessita do NAD para seu desenvolvimento (FODOR et al., 1989; DOM et al., 1994). Através de estudos realizados o biotipo 2 se mostrou menos virulento que o biotipo 1 (DOM; HAESEBROUCK, 1992). Dessa forma, foram descritos para o App 12 sorotipos do biotipo 1 (sorotipo 5 apresenta dois subtipos 5A e 5B) (NICOLET, 1971; ROSENDAL; BOYD, 1982), o sorotipo 13 e 14 para o biotipo 2 (NAD-independente) e o sorotipo 15 que também pertence ao biotipo 1 (BLACKALL et al., 2002).

Quanto aos níveis de virulência, podem ser definidos em três: maior virulência, moderados e menor virulência. Estudos indicaram que os sorotipos 1, 5, 9, 10 e 11 são os mais virulentos, estando geralmente envolvidos em surtos severos, com extensas lesões pulmonares e elevada mortalidade (HAESEBROUCK et al., 1997). Os sorotipos 2, 4, 6, 7, 8, 12 e 15 são moderados e o sorotipo 3 é considerado de menor virulência, mas também são encontrados ocasionando enfermidade em diversos países (BECK et al., 1994). Já os demais, 13 e 14, são isolados raramente. No Brasil, foram relatadas a ocorrência dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (PIFFER et al., 1997; KUCHIISHI et al., 2007), sendo que os sorotipos 3, 5 e 7 são considerados de grande ocorrência e importância, principalmente, para os criatórios suínos na região Sul (PIFFER et al., 1997), sendo o sorotipo 5 considerado o mais prevalente dentre esses (KUCHIISHI, 2007).

Os sorotipos descritos são definidos pela produção de uma ou mais citotoxinas (ApxI, ApxII, ApxIII a ApxIV) pertencentes a família de toxina RTXs (do inglês, *Repeat in the Structural Toxin*), sendo a ApxIV comum para todos os sorotipos. O conhecimento do sorotipo de *A. pleuropneumoniae* prevalente numa determinada região auxilia os estudos de epidemiologia, profilaxia e seleção do teste sorológico sorotipo específico a ser empregado. A sorotipificação do patógeno é importante por confirmar o prévio diagnóstico microbiológico (NIELSEN, 1988; TAYLOR, 1999) e para o adequado emprego de vacinas, as quais são sorotipo específico (MITTAL et al., 1993).

Histórico

No Brasil, a PPS foi diagnosticada pela primeira vez em 1981 (LOCATELLI et al., 1981) no Estado de Santa Catarina, sendo que posteriormente, vários surtos foram observados ainda no Sul do país (PIFFER et al., 1987).

Importância

Por ser uma das mais importantes doenças respiratórias de suínos, a PPS acarreta perdas econômicas em todas as idades. A sua importância não é somente pelo fato de poder conduzir à morte, mas também da redução da produção, aumento do índice de conversão e custos associados à terapêutica e profilaxia, além de perdas com possíveis condenações de carcaças (SOBESTIANSKY et al., 1998; TAYLOR, 1999).

Straw et al. (1989) afirmam que a PPS ocasiona, em média, uma diminuição no ganho de peso diário de 34% e uma redução de 26% na eficiência alimentar. Além disso, em torno de 10 a 20% das carcaças dos animais provenientes de rebanhos infectados são totalmente condenadas no frigorífico. Esta doença está associada com até 20% de redução no desenvolvimento corpóreo (ROHRBACH et al., 1993) e a mortalidade pode ser de 10 a 20% durante os surtos, porém, é usualmente menor que 1% em rebanhos com infecção crônica (CHRISTENSEN et al., 1999).

Segundo trabalho realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Concórdia no Estado de Santa Catarina, Talamine et al. (2006) estimaram os custos na produção do suíno vivo posto na indústria tanto para a fase de leitões como de terminação, ambos no sistema de integração. A remuneração é feita conforme desempenho do lote, geralmente sendo considerada a conversão alimentar, a taxa de mortalidade, a idade e o peso de abate. Dessa forma, a remuneração do produtor está baseada não só no preço do suíno, mas também no peso da carcaça e o consumo de ração. A avaliação foi realizada buscando analisar os índices zootécnicos em lotes de 350 animais aparentemente saudáveis, os quais são encaminhados para o abate aos 120 dias com 118 kg aproximadamente, permitindo produzir 2,8 lotes por ano. Os custos são elevados e todos planejados, isso esclarece a importância de haver uma sanidade adequada no rebanho, para garantir animais em condições adequadas de idade de abate e peso. Animais que não atingem o peso ideal na idade estipulada vão causar prejuízos à granja pelos custos de alimentação e manutenção do animal, enquanto poderia se alojar animais rentáveis. Além disso, animais doentes, quando encaminhados ao frigorífico, podem causar prejuízos e se tratando de Pleuropneumonia, a perda é ainda maior por haver o descarte da carcaça, conferindo a importância do diagnóstico precoce na granja.

Epidemiologia

A transmissão ocorre por via aerógena e por contato direto com suínos infectados da mesma baia ou de baia adjacente (SOBESTIANSKY et al., 1999). Acredita-se que o App seja inalado atingindo os alvéolos pulmonares via traqueia e brônquios (NICOLET, 1992; ABASCAL et al., 1994). Em distância acima de quatro metros é difícil ocorrer transmissão, fato esse que pode ser observado em baias com infecção e outras ausentes de infecção, porém há alguns trabalhos realizados que comprovaram o papel importante dos aerossóis e do movimento do ar na disseminação de App em distâncias superiores a 2,5 metros (JOBERT et al., 2000; CHIERS et al., 2002). A transmissão por meio de botas, roupas e equipamentos é considerado raro (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Suínos de todas as idades podem ser acometidos, entretanto leitões em fase de crescimento, menores de seis meses, pertencentes a rebanhos cronicamente infectados, estão entre os mais vulneráveis e severamente afetados (TAYLOR, 1999). Segundo Sobestiansky et al. (1998), os surtos ocorrem geralmente naqueles animais que estão entre setenta e cem dias de idade. Após essa fase, segue-se a forma crônica, afetando principalmente os animais na terminação, os quais permanecem portadores.

Os portadores assintomáticos são considerados a forma mais importante de manutenção da infecção no rebanho e de transmissão da doença entre rebanhos, pelo trânsito e comércio de animais (ROSENDAL; MITCHELL, 1983).

Sinais clínicos

A enfermidade pode apresentar tanto manifestações clínicas severas, como se tornar crônica e subclínica (TAYLOR, 1999). Experimentos conduzidos revelaram que sinais clínicos muito severos e lesões pneumônicas mais extensas estão presentes em suínos infectados com *M. hyopneumoniae*, seguido por uma infecção com App (YAGIHASHI et al., 1984).

A PPS pode apresentar forma clínica superaguda, aguda e crônica. Na forma superaguda, os animais podem ser encontrados mortos nas terminações, sem terem mostrado sinais clínicos prévios. Na forma aguda observa-se anorexia, prostração, hipertermia, dificuldade respiratória e tosse profunda. Os animais podem ficar em posição de “cão sentado” nos cantos das baias. Já na forma crônica, os únicos sinais observados são a falta de desenvolvimento e acessos esporádicos de tosse. Nesse caso, podem ser observadas aderências de pleura e pericárdio, com condenações de carcaças nos frigoríficos (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Lesões ao abate e análise histopatológica

Segundo Sobestiansky et al. (1999), as lesões apresentam-se com maior frequência nos lobos diafragmáticos e cardíacos direitos, além da pleura adjacente às lesões pulmonares mostrar-se afetada. Entretanto, Taylor (1999) afirma que as lesões podem ser encontradas bilateralmente e além dos lobos diafragmáticos e cardíaco, no lobo apical também é frequentemente observado.

Quanto as lesões macroscópicas, nos casos hiperagudos, as vias respiratórias contem um exsudado espumoso sanguinolento (SHOKOUHI, 1998). Já a forma aguda apresenta lesões fibrinosas e necro-hemorragicas no pulmão e pleurite. Em casos crônicos, observam-se nódulos encapsulados no parênquima pulmonar (MORES et al., 1984), abscessos pulmonares, pleurite e pericardite fibrinosas com aderências (SOBESTIANSKY et al., 1999; TAYLOR, 1999 apud DAL BEM, 2008).

Segundo Alberton et al. (2008), as lesões mais características provocadas por este agente estão localizadas na região dorso-caudal do parênquima pulmonar, constituídas por nódulos de tecido necrótico ou purulento.

Quando há existência de pleurite fibrinosa, as zonas pneumônicas são escuras e duras (TAYLOR, 1999). Dessa forma, achados de necropsia, como pleurisia, pneumonia exsudativa e necrose podem ser sugestivas de PPS (GRAM et al., 1996), sendo a doença caracterizada pelo desenvolvimento de broncopneumonia necrosante, hemorrágica e pleurite fibrinosa (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

A pleura pode estar comprometida, apresentando-se espessada e com tecido fibroso, e muitas vezes, com aderências à parede costal (ALBERTON et al., 2008).

Cabe salientar que os efeitos das enfermidades respiratórias sobre os suínos costumam ser medidos pela avaliação das lesões ao abate (NOYES et al., 1990), devendo-se considerar que alguns animais podem apresentar recuperação sem vestígios de sequelas, porém demonstrando prejuízo sobre o ganho médio diário de peso (PIFFER et al., 1987).

Na análise histopatológica, há presença de zonas de necrose delineadas por uma zona de reação por neutrófilos necróticos e, em casos crônicos, por tecido fibroso. Os septos interlobulares apresentam-se dilatados por exsudado fibrinopurulento (TAYLOR, 1996). O edema pulmonar e a necrose estão relacionados com trombose na microvasculatura pulmonar e ativação de neutrófilos (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Ou seja, há uma pleuropneumonia exsudativa fibrino-hemorragica, com predomínio de células mononucleares, trombose de vasos sanguíneos e linfáticos, levando a uma grande área de necrose coagulativa (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Diagnóstico

O diagnóstico da PPS é uma etapa fundamental para o estabelecimento de ações preventivas nas granjas (FERRAZ et al., 2010). Dessa forma, mostra-se a importância da realização de estudos otimizando resultados que evitem possíveis disseminações e preconizem a sanidade suídea.

O diagnóstico deste tipo de pleuropneumonia é feito a partir da anamnese e das lesões macro e microscópicas e pode ser confirmado por meio do isolamento do agente e sua identificação, bem como sorologicamente e por biologia molecular. É de suma importância fazer a diferenciação de outros patógenos presentes no trato respiratório, como: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus* sp, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida* e *Bordetella bronchiseptica* (GRAM et al., 1996).

Segundo Sobestiansky et al. (1999), na forma crônica, geralmente, o diagnóstico se faz pelas lesões encontradas no matadouro e pela pesquisa do agente nessas lesões, ou por meio da sorologia dos suínos na terminação. Ao abate, no diagnóstico macroscópico, os pulmões e pleura são examinados quanto à presença de lesões, determinando a ocorrência, prevalência e eficiência dos métodos de controle, bem com a presença das formas clínicas de enfermidades (KICH; PONTES, 2001).

Um método que pode ser utilizado para detecção do anticorpo é o diagnóstico sorológico por meio da técnica de ELISA (BOSSÉ et al., 1990).

A técnica de ELISA vem sendo muito utilizada e veio substituir o teste de fixação de complemento, o qual era considerado o teste padrão de diagnóstico. O ELISA inicialmente era uma prova de detecção da espécie, sendo atualmente uma prova específica do sorotipo. O teste imunológico ELISA, e a cultura bacteriana são técnicas consideradas tradicionais por alguns autores para o diagnóstico da infecção por App (SCHALLER et al., 2001).

Uma outra forma de detectar esse agente, é a técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a qual tem sido relatada por diversos autores. Segundo Ferraz et al. (2010), a principal vantagem em relação ao isolamento bacteriano é a possibilidade de amplificar material genético de amostras não viáveis biologicamente, o que minimiza resultados falso-negativos. Além disso, facilita a identificação de amostras não-sorotificáveis, reduz o tempo necessário para a obtenção de resultados conclusivos, bem como otimiza estratégias de isolamento bacteriano, aumentando as possibilidades de detecção do agente e agilidade no diagnóstico (CHO; CHAE, 2001; COSTA et al. 2004).

Controle e profilaxia

Atualmente, essa enfermidade pode estar presente em diversas granjas, por este motivo, o monitoramento sanitário dos animais introduzidos no plantel, oriundo de outras propriedades, deve ser sempre preconizado.

Essa enfermidade tem sido controlada por meio da vacinação, que impede a mortalidade, mas não a infecção. A erradicação da doença num plantel pode ser difícil pela presença dos portadores, sendo recomendado eliminar o rebanho e repopular com animais livres do agente. Os estudos que estão sendo desenvolvidos no Brasil demonstram o interesse e a importância desta enfermidade em suínos e as pesquisas têm buscado metodologias mais específicas e sensíveis para o diagnóstico (RUIZ et al., 2005).

Espera-se que a adoção de medidas eficazes de controle e profilaxia também deva contribuir para o controle e erradicação da PPS nos rebanhos brasileiros. A limpeza e desinfecção das baias são de suma importância para o controle da infecção no rebanho e o uso de antibióticos deve ser sempre acompanhado por um médico veterinário, que estabelecerá por meio de testes de antibiograma, qual é o medicamento mais adequado (RUIZ et al., 2005).

2.2.2 PNEUMONIA ENZOÓTICA DOS SUÍNOS (*Mycoplasma hyopneumoniae*)

Definição e Etiopatogenia

O *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) é o patógeno responsável pela Pneumonia Enzoótica Suína (PES) ou Pneumonia Micoplásmica Suína, e que na maioria das vezes está associado a agentes secundários, como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e com viroses suínas, incluindo as síndromes respiratórias e também reprodutivas (CALSAMIGLIA et al., 1999b; THACKER et al., 1999).

É considerada uma das principais doenças respiratórias dos suínos, sendo que esse agente destrói o principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório, o elevador mucociliar (DEBEY; ROSS, 1994).

Importância

Considerada uma enfermidade respiratória crônica, quando interage com outros patógenos secundários, ocasiona redução na taxa de crescimento, piora na taxa de conversão alimentar, aumento nos custos de medicação e aumento nos índices de mortalidade e depreciação de carcaças no frigorífico, devido à aderência de pleura e abscessos pulmonares (MAES, 2010; MAES et al., 1996).

A PES possui alta morbidade e baixa mortalidade e as perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Epidemiologia

A principal forma de transmissão da infecção pelo *Mycoplasma* é o contato nasal-nasal com secreções respiratórias (JANKE, 1997), contanto com aerossóis induzidos pela tosse (DESROSIERS, 2001) ou, menos frequentemente, por fômites (BATISTA et al., 2004).

A doença geralmente dissemina-se vagarosamente, podendo ocorrer transmissão vertical das porcas para os recém-nascidos (KOBISCH, 2000), ou transmissão horizontal de leitões mais velhos para os mais jovens (KOBISCH, 2000). O agente multiplica-se no trato respiratório do suíno, e pode ser excretado durante tosses ou espirros (SOBESTIANSKY, 1999).

Por mais que esse agente possa afetar suínos de todas as idades, a forma clínica da doença é mais comum nos animais da fase de crescimento e terminação. Variáveis ambientais e de manejo favorecem a sua ocorrência e severidade, por isso é considerada uma doença multifatorial (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Sinais clínicos

A PES é uma doença infecciosa crônica, muito contagiosa, caracterizada por uma broncopneumonia catarral que geralmente cursa com complicações broncopulmonares purulentas e que se manifesta clinicamente por tosse seca e atraso no crescimento (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Lesões ao abate e análise histopatológica

Segundo Andreasen et al. (2001), as lesões de PES estão também associadas com as pleurites no abate, sendo que nos suínos que desenvolvem a doença mais precocemente, aumenta a chance de apresentarem pleurites na ocasião do abate.

É também observado nos animais que soroconvertem precocemente mais pleurite, o que pode ser explicado por uma maior severidade da PES em animais mais jovens, predispondo as infecções secundárias.

De acordo com Alberton et al. (2008), a PES causa lesões na região cranioventral do pulmão, localizadas principalmente nas extremidades dos lobos apicais, cardíacos, intermediários e região anteroventral dos diafragmáticos. Estas lesões apresentam uma consistência como a de músculo, sendo bem delimitadas do tecido normal. Possuem uma coloração púrpura à cinza e geralmente os linfonodos apresentam-se bastante reativos.

As lesões histopatológicas causadas por Mhyo possuem padrão histomorfológico de pneumonia broncointersticial, sendo caracterizadas no estágio agudo por perda dos cílios, esfoliação das células epiteliais, acumulação de neutrófilos e macrófagos na luz dos brônquios e bronquíolos e nos alvéolos adjacentes (DUNGWORTH, 1993; KWON et al., 2002).

Diagnóstico

Quanto às ferramentas diagnósticas para monitorar os programas de controle e/ou erradicação da doença, os sinais clínicos, sorologia e inspeção de lesões pulmonares no abate são as mais utilizadas.

A sorologia, especificamente o ELISA, é o instrumento diagnóstico mais utilizado para determinar a presença de Mhyo num rebanho, mas, devido à baixa sensibilidade dos testes de ELISA disponíveis (ERLANDSON et al., 2005), não devem ser usados isoladamente.

De acordo com Tracker (2007), para implementar estratégias de erradicação de um microrganismo, é fundamental contar com técnicas de diagnóstico capazes de detectar com precisão os animais infectados, por isso a PCR deve ser considerada, por ter sensibilidade e especificidade satisfatória. Além disso, é fundamental associar as lesões encontradas na histopatologia.

Controle e profilaxia

Apesar dos esforços e estratégias de controle adotados, o Mhyo continua sendo um organismo amplamente difundido nas populações de suínos, o que torna a erradicação da doença ocasionada pelo mesmo, uma tarefa muito difícil e frustrante (VILLAREAL, 2010).

As únicas vacinas contra a PES disponíveis no mercado são as bacterinas. Elas conferem proteção aos suínos, caracterizada pela redução das lesões e melhora dos índices de produtividade (ganho de peso e conversão alimentar), porém não impedem a colonização de Mhyo nem o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que este tipo de vacina não estimula uma adequada imunidade de mucosa. Apesar disso, reduzem de forma significativa o impacto econômico da PES (MAES et al., 1999; MOREAU et al., 2004).

Para controlar e erradicar a PES, assim como outras doenças, o método mais eficaz é o despovoamento total seguido de repovoamento com animais livres do patógeno em questão (HARRIS, 2000).

Segundo afirmado por Maes et al. (2008), nem a vacinação, nem a medicação preventiva podem prevenir a infecção e aderência de Mhyo nas células ciliadas do trato respiratório. Em casos de níveis elevados de infecção ou em rebanhos com instalações e manejo precário, o uso de antimicrobianos pode ser necessário para melhores resultados na vacinação e para a melhora clínica e das lesões.

2.2.3 PASTEURELOSE PULMONAR (*Pasteurella multocida*)

Definição e etiopatogenia

A *Pasteurella multocida* (Pm) é o agente causador da pasteurelose pulmonar dos suínos e geralmente está associado a infecções secundárias no Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC) (MORES, 2006).

A *P. multocida* tipo capsular D (PmD) está envolvida na etiologia da rinite atrófica progressiva e a do tipo capsular A (PmA) é considerada agente complicador de processo pneumônicos, causados pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e pode ser isolado em mais de 90% das lesões pulmonares em suínos, sendo considerado um agente importante e prevalente como causa de diferentes infecções respiratórias nessa espécie (NOYES, 1990; HOIE, 1991; KICH et al., 2007, BOROWSKI, 2002; JORDAN, 2006; MORÉS, 2006; PIJOAN, 1999 e ZUCKER et al., 1996).

De acordo com Kich et al. (2007), após a infecção experimental de PmA, as observações do quadro clínico e lesões após necropsia sugeriram que a PmA pode também

ser agente primário de lesões pulmonares e alerta para o diagnóstico diferencial com *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) e *Haemophilus parasuis* (HPS).

Dois dos agentes bacterianos muito prevalentes, a PmA e *Streptococcus suis*, são habitantes normais do trato respiratório superior dos suínos, sendo que por muitos são considerados agentes oportunistas nas lesões respiratórias causadas por vírus ou por *Mycoplasma hyopneumoniae* (HIGGINS, GOTTSCHALK, 2006; JORDAN et al., 2006).

Importância e epidemiologia

A Pm é observada em granjas produtoras de suínos em todo o mundo, até mesmo naquelas de elevado *status* sanitário (KICH et al., 2010). Nos últimos anos muitos autores têm reportado a presença desse agente em pulmões de suínos em diversos países (PIJOAN et al., 1984; ZHAO et al., 1992) e em vários tipos de clima e condições de criação. No Brasil, é cada vez maior o número de isolamentos de cepas dessa bactéria a partir de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite (BOROWSKI, 2007).

Como toda doença respiratória, podem causar perdas econômicas devido aos casos de mortalidade, atraso no desenvolvimento, falta de uniformidade dos lotes, condenação das carcaças e gastos com medicamentos (BOROWSKI, 2007). Desta forma, a pneumonia em suínos é considerada uma doença de alto custo (PIJOAN, 2006).

Alguns pesquisadores no sul do Brasil (BOROWSKI, 2002; MORÉS, 2006; BOROWSKI et al., 2007; KICH et al., 2007, 2010) têm sugerido ser um agente capaz de induzir quadro de extrema gravidade, similar aos observados na Pleuropneumonia causada por *A. pleuropneumoniae* e pelo *H. parasuis*, podendo causar pleurite e pericardite fibrinosas e mortalidade em animais de crescimento e terminação. Médicos veterinários especializados em suínos também relatam a observação da mudança do perfil patológico do quadro de Pasteurelose em suínos de terminação. Esses relatos podem indicar que cepas de Pm de alta virulência, capazes de causar lesões pneumônicas típicas de *A. pleuropneumoniae* e/ou *H. parasuis* estejam circulando nos rebanhos suínos brasileiros, em especial nas regiões de produção mais expressiva como Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso.

Sinais clínicos

Os sinais clínicos variam em severidade, dependendo da cepa de *P. multocida* e do grau de imunidade do animal. Existem três formas clínicas: aguda, subaguda e crônica (PIJOAN, 1999).

A forma aguda pode ter mortalidade variando de 4 a 50%, porém, sua infecção é rara. A forma subaguda está associada a cepas que causam pleurite, sendo confundido com a Pleuropneumonia causada pelo App, com aparecimento de tosse e respiração abdominal em suínos na fase de crescimento e terminação, no entanto, não se observa morte súbita. A forma crônica é a mais comum e caracteriza-se com tosse de severidade variável. Os animais são acometidos entre 10 e 16 semanas de vida e por ser uma exacerbação ou continuação da pneumonia por micoplasmose, sendo clinicamente indistinguível com o *Mycoplasma hyopneumoniae* (BOROWSKI, 2007).

Lesões ao abate e análise histopatológica

As lesões ocorrem na cavidade torácica observando-se áreas de consolidação do pulmão de coloração avermelhada ou acinzentadas. Pode ocorrer a evolução para um quadro de pleurite e abscessos, com aderência da pleura na parede torácica (BOROWSKI, 2007). Os linfonodos mediastínicos apresentam aumento de volume e ao corte, cor avermelhada (PIJOAN, 2006)

As lesões de PmD caracterizaram-se, principalmente, por grandes nódulos de tecido necrótico purulento, envoltos por uma cápsula fibrosa espessa, com ou sem envolvimento de pleura. Estas lesões localizaram-se, na maioria das vezes, na região dorsocaudal do pulmão.

As lesões de PmA caracterizam-se, principalmente, por nódulos de hepatização do parênquima pulmonar, com ou sem necrose, com exsudação mucopurulenta nos brônquios e bronquíolos e deposição de fibrina sobre a pleura visceral, localizadas nos lobos cardíacos e diafragmáticos. Este agente também provoca pleurite fibrinosa, sem alterações no parênquima pulmonar.

As lesões microscópicas são similares aos presentes na maioria das pneumonias bacterianas com broncopneumonia exsudativa, presença de neutrófilos no exsudato mucopurulento nos brônquios e alvéolos. Também tem sido relatada a presença de nefrite intersticial associada à broncopneumonia (BOROWSKI et al., 2007).

Diagnóstico

Tanto os sinais clínicos como as lesões da infecção por Pm, não são patognomônicos e não podem ser usados como único critério para o diagnóstico definitivo da doença. A associação do histórico da doença, lesões na histologia, biologia molecular e o isolamento do agente é a melhor maneira de se confirmar o diagnóstico (PIJOAN, 2006).

Testes sorológicos não têm provado eficiência no diagnóstico da Pasteurelose, não sendo indicados para a detecção rotineira de Pm (PIJOAN, 2006).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outros agentes envolvidos em pneumonias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, vírus da influenza, *Mycoplasma hyopneumoniae*, além do *Streptococcus* sp (BOROWSKI, 2007).

Controle e profilaxia

A terapia antimicrobiana é largamente utilizada na suinocultura com funções terapêutica e profilática (BOROWSKI, 2002), mas é de grande importância que medidas profiláticas de controle ambiental e sanitário sejam preconizadas.

2.2.4. DOENÇA DE GLASSER (*Haemophilus parasuis*)

Definição e etiopatogenia

A Doença de Glasser é uma doença infecciosa e septicêmica, caracterizada por poliserosite, poliartrite e meningite, acometendo principalmente os leitões, causando mortalidade, refugos entre os sobreviventes e depreciação da carcaça no frigorífico. O agente etiológico é o *Haemophilus parasuis* (HPS), um bastonete imóvel, Gram negativo, não hemolítico e NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) dependente (MENIN et al., 2005; SOBESTIANSKY et al., 1999).

Devido a detecção do agente também em aparelhos respiratórios de animais sadios, sua patogenia é pouco conhecida ainda. Porém, sabe-se que a infecção ocorre através de aerossóis e o *H. parasuis* possui tropismo particular para as membranas serosas, sinovial e meníngea e para o parênquima pulmonar (SOBESTIANSKY et al., 1999). Locais de colonização inicial no trato respiratório superior de suínos ainda não foram identificados (NEDBALCOVA et al., 2006).

O *H. parasuis* pode ser isolado de porções intermediárias do trato respiratório, e pode estar acompanhado de rinite supurativa e perda de células microciliadas, o que indica que a *Bordetella bronchiseptica* pode estar envolvida como fator predisponente para a ocorrência da Doença de Glasser (VAHLE et al., 1997; BROCKMEIER, 2004 apud NEDBALCOVA et al., 2006).

Importância

A Doença de Glasser tem emergido como uma importante doença bacteriana que acomete suínos do mundo todo (RAPPGABRIELSON, 1999 Apud MACÊDO et al., 2009). Atualmente é considerada uma das doenças mais importantes economicamente na indústria de suínos devido aos altos custos com tratamentos com antibióticos e o descarte de animais (NEDBALCOVA et al., 2006).

As consequências econômicas são devido à mortalidade de leitões, ao elevado número de refugos entre os sobreviventes e à depreciação das carcaças dos animais afetados (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Epidemiologia

O *H. parasuis* está distribuído de forma ampla no mundo inteiro. É um dos primeiros agentes a colonizar o aparelho respiratório de suínos sadios, afetando animais comprometidos pelo estresse, com maior frequência entre cinco e oito semanas de idade (SOBESTIANSKY et al., 1999).

No Brasil, dos 15 sorovares conhecidos, o 4 é o mais prevalente. Porém já foram identificados os sorovares 2, 5, 13 e 14, sendo os três últimos as cepas de alta patogenicidades (MORENO et al., 2011; CASTILLA et al., 2012).

A Doença de Glasser é considerada uma doença esporádica em leitões, e quando associada a fatores estressantes como desmame, transporte dos animais, mudança de ambiente, mistura de lotes, baixas temperaturas e até mesmo a presença de outros patógenos como, por exemplo, o Circovírus, ocasiona a queda da resistência e consequente, o desenvolvimento da doença (SANTOS et al., 1998 apud ALMEIDA et al., 2008; SOBESTIANSKY et al., 1999; KICH, PONTES, 2001).

A transmissão acontece por contato direto e a transmissão indireta é apenas hipotética. O agente é introduzido em um rebanho pela compra de animais de rebanhos infectados. Situação semelhante pode ocorrer em um rebanho infectado quando uma nova cepa virulenta e antígenicamente diferente é introduzida (OLIVEIRA; PIJOAN, 2002).

Os leitões podem se infectar com o *H. parasuis* durante a amamentação, desde que a porca elimine cepas patogênicas e não patogênicas pelo leite. Porém, a eliminação desse agente pelo leite é baixa e somente alguns leitões serão acometidos pela doença (NEDBALCOVA et al., 2006).

Leitões acometidos durante a amamentação adquirem sua própria imunidade e se tornam portadores. No entanto, a medida que estes leitões vão se desmamando, a frequência da eliminação do agente aumenta, devido a queda na imunidade causada pelo

estresse da própria desmama. Os leitões que não se infectaram neste período, são protegidos pela imunidade do colostro, que diminuem em torno de cinco a seis semanas de vida. Após este período, estes suínos se tornam altamente susceptíveis, surgindo as manifestações clínicas da doença (SOLANO-AGUILAR et al., 1999; OLIVEIRA; PIJOAN, 2002).

Sinais clínicos

Os animais doentes apresentam sinais clínicos variados, que vão depender do estado imune do rebanho, virulência da cepa e estágio da infecção. Os suínos geralmente adoecem de forma súbita entre cinco e oito semanas de idade, apresentando anorexia, febre e apatia. Podem ocorrer tosse, dispneia, cianose, inflamação e dores nas articulações, claudicação, tremores, incoordenação e decúbito lateral. O leitão infectado pode morrer ou evoluir para a forma crônica com aparecimento de artrite crônica e aderência das seroras (SOBESTIANSKY et al., 1999; MENIN et al., 2005).

O *H. parasuis* pode estar associado a três formas clínicas: (i) exsudação serofibrinosa e purulenta envolvendo qualquer serosa (poliserosite) incluindo membrana sinovial, peritônio, pleura, pericárdio e meninges; (ii) septicemia sem poliserosite, podendo ocorrer morte súbita e hemorragia renal subcapsular; (iii) pneumonia onde o *H. parasuis* pode estar envolvido como agente primário ou secundário (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Lesões ao abate e análise histopatológica

A diversidade de lesões também varia de acordo com os mesmos fatores que interferem a presença dos sinais clínicos. As principais lesões encontradas são pleurite, pericardite, peritonite, poliartrite e meningite, com exsudação fibrinosa ou serofibrinosa, e às vezes áreas de pneumonia hemorrágica. Essas lesões podem existir em várias combinações ou isoladamente (SOBESTIANSKY et al., 1999; MENIN et al., 2005).

Nos casos crônicos, as lesões são observadas em abatedouro, com a presença de aderência nas serosas torácicas e abdominais e conteúdo fibrino-purulento nas articulações (SOBESTIANSKY et al., 1999).

As lesões microscópicas se caracterizam por inflamação fibrino-purulenta com infiltração de neutrófilos e alguns mononucleares nas serosas afetadas. Em casos mais graves, a meningite, meningoencefalite, trombótica acompanhada com um aumento da produção de fluido cefalorraquidiano e artrite são encontradas (NICOLET, 1992; AMANO et al., 1994; SOBESTIANSKY et al., 1999).

Diagnóstico

O diagnóstico deve ser baseado no histórico, sinais clínicos e lesões. Frequentemente se suspeita da doença no campo, porém, a confirmação laboratorial por meio do isolamento é o melhor método de diagnóstico (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Ao selecionar animais ou tecidos para amostragem, alguns critérios devem ser seguidos. Os suínos escolhidos devem apresentar sinais clínicos característicos da infecção, não terem recebido tratamento com antibióticos por pelo menos uma semana e devem ser sacrificados, pois animais já mortos têm as chances de isolamento de *H. parasuis* diminuídas (NEDBALCOVA et al., 2006).

A utilização desta técnica é difícil, pois necessita de meios seletivos contendo bacitracina ou cristal violeta. Resultados negativos no cultivo não necessariamente indicam que *H. parasuis* não está afetando o rebanho, pois muitas vezes o agente está presente em baixo número na amostra, o tempo decorrido entre a morte do animal e a colheita de material pode ter sido extenso, o animal foi medicado ou a colheita, manuseio e transporte do material pode ter sido feito de forma inadequada (SOBESTIANSKY et al., 1999; NEDBALCOVA et al., 2006).

Isolamentos positivos também devem ser interpretados com cuidado, pois o agente é um microrganismo comensal do trato respiratório superior de suínos e pode ser comumente isolado de cavidades nasais, amígdalas e traqueia de animais saudáveis. Portanto, é importante saber o local onde o agente foi isolado, pois existe uma grande diferença entre as cepas do trato respiratório superior, do pulmão e de sítios sistêmicos. As cepas que causam doença sistêmica geralmente são de alta virulência e tem baixa predileção ao trato respiratório superior. Já as cepas predominantes da cavidade nasal e tonsila são de baixa virulência (OLIVEIRA; PIJOAN, 2002).

O isolamento de *H. parasuis* de locais sistêmicos ou de lesões macroscópicas pode garantir que o agente isolado esteja envolvido no processo da infecção (RAPP-GABRIELSON, 1999).

Técnicas de biologia molecular têm se tornado bastante integradas na prática da epidemiologia de doenças infecciosas, para caracterizar de forma precisa as amostras de organismos. A técnica de PCR é uma excelente ferramenta para diagnóstico e para avaliação das estratégias de controle e erradicação da doença. Os suabes de tonsilas são as amostras de eleição para definir a prevalência da colonização em marrãs, porcas ou leitões (MACÊDO, et al., 2009; OLIVEIRA, 2009).

O diagnóstico sorológico é considerado inconsistente e impreciso. A detecção de anticorpos contra *H. parasuis* é representada pela fixação de complemento (FC), hemaglutinação indireta (HI) e ELISA (NEDBALCOVA et al., 2006).

Os sinais clínicos e as lesões não são específicos e devem ser diferenciados. Existem outras doenças bacterianas e virais agudas com febre concomitante como: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis* e *Influenzavirus* (NICOLET, 1992; RAPP-GABRIELSON, 1999).

Controle e profilaxia

O uso de antibióticos para tratamento do *H. parasuis* é utilizado. A antibioticoterapia parenteral deve ser iniciada o mais rapidamente possível após a manifestação dos sinais clínicos. Como medida de prevenção pode-se optar por medicar o lote por via oral (água ou ração) (NICOLET, 1992).

A aplicação de vacinas comerciais ou autógenas pode ser utilizada para profilaxia da doença, porém, as vacinas comerciais têm se mostrado inconsistentes em rebanhos distintos. Este fato pode estar relacionado à presença de diferentes sorovares ou falha na proteção cruzada. Embora fatores de virulência e antígenos protetores de *H. parasuis* não sejam bem conhecidos ainda, é amplamente aceito que exista imunidade específica do sorotipo (SOBESTIANSKY et al., 1999; MENIN et al., 2005; NEDBALCOVA et al., 2006).

A prevenção da doença deve ser aliada às práticas de manejo, para reduzir ou eliminar outros patógenos respiratórios e reduzir os fatores de estresse (SOBESTIANSKY et al., 1999).

2.2.5. DOENÇA RESPIRATÓRIA CAUSADA POR *Streptococcus* sp

Definição e etiopatogenia

O grupo de *Streptococcus* hemolítico, oriundo de infecções em suínos, foi caracterizado pela primeira vez por Moor entre 1956 e 1963 (MOOR, 1963). Estes *Streptococcus* caracterizam-se por serem Gram positivos, geralmente imóveis e por não formarem esporos. Apresentam a formação de longas cadeias, mas podem ter a formação de pequenas cadeias de quatro células ou de cocos agrupados em duas células (GOMES, 2013).

O *Streptococcus suis* foi identificado em 1987, sendo desde então reconhecidos 35 distintos sorotipos. Dentre estes, o sorotipo 2 tem sido o mais comumente isolado de animais doentes, embora outros sorotipos possam também estar associados a casos graves

de infecções (CLOUTIER et al., 2003). No Brasil, o sorotipo 2 também tem sido o mais isolado de suínos enfermos (COSTA et al., 2005), acometendo suínos em qualquer faixa etária (WINDSOR; ELLIOT, 1975), sendo considerado o mais importante na suinocultura.

Importância

O *Streptococcus suis* é considerado um importante patógeno para a suinocultura (WINDSOR; ELLIOT, 1975), pois pode desencadear prejuízos econômicos, pela mortalidade dos animais, perda de peso, gastos com medicamentos, além do trabalho para tratá-los (CLIFTON-HADLEY et al., 1986).

É um agente conhecido e de significância clínica na maioria dos países onde a suinocultura é intensiva (MAROIS et al., 2007). Esse patógeno está associado a doenças em suínos, tais como meningites, artrites, pericardites, septicemia, pneumonia, morte súbita (MAROIS et al., 2007) e infecções em seres humanos (GOTTSCHALK et al., 2007), fato esse que há grande preocupação.

O caráter zoonótico que a enfermidade apresenta é um fator adicional para indicar a importância deste agente, pois têm sido relatados vários casos de infecção humana por *S. suis* tipo II, principalmente na Europa. As pessoas afetadas geralmente apresentavam alguma ligação com atividades ligadas à suinocultura, como os criadores de suínos, peões, magarefes e médicos veterinários, sendo a doença considerada de caráter ocupacional (CLIFTON-HADLEY, 1983). Os sinais clínicos observados em humanos são septicemia e meningites (ARENDS; ZANEN, 1988), surdez devido à seqüela, além de problemas de coração. A via principal de contaminação para o homem é a cutânea, geralmente por lesões da pele durante o trabalho com suínos, ou por instrumentos cortantes.

Epidemiologia

A enfermidade afeta principalmente animais jovens e que estão sob condições de alta densidade populacional. A incidência da doença varia entre os rebanhos e as condições que os mesmos se encontram. A maior fonte de disseminação da doença são os próprios suínos portadores, que albergam o agente nas amígdalas e, ocasionalmente, na mucosa nasal. Quando infectados, estes animais podem permanecer portadores por até seis meses (CLIFTON-HADLEY, 1983).

Um estudo realizado no Japão por Kataoka et al. (1993) mostra os aspectos epidemiológicos da infecção por *S. suis*, onde foi isolado *S. suis* sorotipo 2 em 28,2% das 380 amostras. A maioria dos isolados era proveniente de casos de meningite, pneumonia e endocardite, demonstrando a agressividade do sorotipo 2 nessa espécie.

Prieto et al. (1993) obtiveram 65 isolamentos de *S. suis* de suínos doentes, sendo que 96% foram tipificados em vários sorotipos, onde o sorotipo 2 representou 53,8% dos isolados, obtendo-se o isolamento de meninges, pulmões e outros órgãos.

Sinais clínicos e lesões macro e microscópicas

A bactéria *Streptococcus* sp e outras bactérias do grupo corineformes podem ocasionar pequenos abscessos disseminados por todos os lobos do parênquima pulmonar, podendo estarem associados com caudofagia ou outras portas de entrada (MORES, 2006).

O *Streptococcus* sp pode causar lesões de broncopneumonia por infecção via aerógena, ou pneumonia embólica por disseminação hematógena. A patogênese da bactéria determina a ectasia bronquiolar, que envolve bronquite crônica com destruição das paredes. Ocorre dilatação permanente de um brônquio ou bronquíolo como resultado do acúmulo de exsudato no lúmen e ruptura parcial das paredes. A destruição das paredes ocorre, em parte, quando enzimas proteolíticas liberadas das células fagocitárias durante a inflamação crônica degradam e enfraquecem os tecidos que compõem a parede e ajudam a manter o diâmetro normal da via aérea (LÓPEZ, 1998).

Sendo assim, o *Streptococcus* sp pode ter outros agentes envolvidos, podendo aumentar as lesões presentes. Pode causar broncopneumonia supurativa como infecção única ou em combinação com *P. multocida* (REAMS et al. 1994, VASCONCELOS et al. 1994), e em combinação com o *H. parasuis*, pode desenvolver pleurite e peritonite fibrinosa ou fibrinopurulenta (REAMS et al., 1994).

Diagnóstico

Em laboratório, é realizada a identificação da bactéria (agente etiológico), onde geralmente é feita a partir do isolamento de colônias oriundas do material de animais doentes. As colônias são pequenas, esverdeadas ou transparentes, e levemente mucoides (GOTTSCHALK et al., 1991).

Controle e profilaxia

O uso de medicação estratégica em períodos com maior probabilidade de ocorrência de surtos é o mais indicado. Fatores relacionados ao manejo que levam a um aumento de estresse devem ser minimizados, e o controle de outras doenças que podem agravar o quadro também deve ser feito (SANFORD; HIGGINS, 1992).

O uso de vacinas para controle do *S. suis* ainda não alcançou os resultados almejados. Apesar de vários estudos realizados com o intuito de esclarecer quais

mecanismos relacionados à resposta imunológica (celular e humoral) são importantes para a proteção do animal, ainda não se conhece com clareza os caminhos necessários para a produção de vacinas realmente eficazes (BUSQUE et al., 1997; WISSELINK et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CETEA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) e registrado sob o protocolo n.130/13 atendendo aos princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) (Anexo 1).

3.2. INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO (Questionário associado a sorologia)

Primeiramente foi realizada uma investigação epidemiológica por meio de um questionário (Anexo 2), tendo esse a finalidade de caracterizar as granjas que estavam sendo analisadas. Além disso, utilizou-se da técnica de sorologia (ELISA), para buscar detectar o agente *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App).

Para isso, foram selecionadas granjas de suínos que apresentassem os seguintes fatores de inclusão e exclusão:

1. A granja não poderia ser somente de subsistência.
2. Os suínos teriam que apresentar sinais clínicos condizentes com doença respiratória, principalmente nas fases de crescimento e terminação.
3. O produtor deveria apresentar dados zootécnicos ou permitir que o grupo deste trabalho verificasse esses dados.
4. Os animais não poderiam ser vacinados contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
5. O produtor devia permitir a colheita do sangue dos suínos, bem como a marcação dos mesmos.
6. Os animais da granja precisavam ser enviados para abate em frigorífico ou matadouro.
7. O frigorífico teria que apresentar algum histórico de lesões respiratórias no abate, advindo de animais da granja escolhida.
8. A granja deveria pertencer ao Estado de São Paulo.

3.3. AMOSTRAS

3.3.1. Colheita de sangue de suínos em granjas e frigoríficos/matadouro

Após a fase de seleção e caracterização das granjas, foi feita a colheita de sangue e identificação dos animais em fase de terminação, na granja ou no frigorífico/matadouro (Figuras 1 e 2), para a investigação epidemiológica da ocorrência do agente App, por meio da detecção de anticorpos pela técnica de ELISA.



Figura 1 - Granja 1. Colheita de sangue em suíno no início da terminação.



Figura 2 - Animais da Granja 4 (Matadouro). Colheita de sangue no momento da exsanguinação.

Foram colhidas amostras de sangue de 192 suínos. Desse total, 35 suínos foram identificados por brincos no início da terminação e também pesados nessa fase (Granja 1), 115 tiveram identificação por marcação australiana e peso nas diferentes fases de vida (Granja 4), 15 suínos foram identificados por brincos no final da terminação e não pesados (Granja 3), e os 27 suínos restantes foram escolhidos aleatoriamente na granja e no frigorífico (Granja 1 e Granja 2) (Quadro 1).

Quadro 1 - Características das granjas de suínos e número de amostras colhidas – São Paulo, 2015.

Granja	Características	Número de animais
Granja 1	Suínos identificados por brincos no início da terminação e pesados nessa fase	35
	Suínos escolhidos aleatoriamente no frigorífico	7
Granja 2	Suínos escolhidos aleatoriamente na granja	20
Granja 3	Suínos identificados por brincos no final da terminação e não pesados	15
Granja 4	Suínos com identificação por marcação australiana e peso nas diferentes fases de vida	115
TOTAL		192

As informações referentes às propriedades selecionadas, fase de criação, data e local da colheita, bem como o número de amostras colhidas, encontram-se dispostas no Quadro 2.

Quadro 2 - Dados referentes à investigação epidemiológica para pesquisa de anticorpos contra o *Actinobacillus pleuropneumoniae*, em diferentes granjas de suínos do Estado de São Paulo – São Paulo, 2015.

Granja	Número de animais	Fase de criação	Local	Data da colheita
Granja 1	35	Início Terminação (100 dias)	Granja	11/04/2014
	7	Final Terminação (140 dias)	Frigorífico	28/04/2014
Granja 2	20	Início Terminação (100 dias)	Granja	09/05/2014
Granja 3	15	Final Terminação (140 dias)	Granja	10/06/2014
Granja 4	17	Final Terminação (140 dias)	Matadouro	07/07/2014
	21	Final Terminação (140 dias)	Matadouro	28/07/2014
	19	Final Terminação (140 dias)	Matadouro	22/09/2014
	40	Final Terminação (140 dias)	Matadouro	22/10/2014
	18	Final Terminação (140 dias)	Matadouro	22/01/2015
TOTAL	192			

É importante salientar que todos os animais analisados não tinham sido vacinados para *A. pleuropneumoniae*.

3.3.2. Colheita de pulmões e linfonodos mediastínicos em frigoríficos e matadouro

A próxima etapa consistiu em acompanhar o abate dos animais da granja 1, 3 e 4 em dois frigoríficos e um matadouro, respectivamente. Os frigoríficos estão localizados na cidade de Cosmópolis e Ibiúna e o matadouro na cidade de Pirassununga, sendo todos pertencentes ao Estado de São Paulo (Quadro 3).

Quadro 3 - Frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, onde foram realizadas as colheitas de pulmões e linfonodos de diferentes granjas – São Paulo, 2015.

Frigorífico/ matadouro	Local	Origem	Data da colheita
Frigorífico 1	Cosmópolis	Granja 1	28/04/2014
Frigorífico 2	Ibiúna	Granja 3	11/06/2014
Matadouro	Pirassununga	Granja 4	07/07/2014
	Pirassununga	Granja 4	28/07/2014
	Pirassununga	Granja 4	22/09/2014
	Pirassununga	Granja 4	22/10/2014
	Pirassununga	Granja 4	22/01/2015

Dessa forma, na ocasião foram colhidos pulmões e linfonodos mediastínicos para diagnóstico laboratorial, observando as lesões macroscópicas (Figura 3) e buscando fazer o processamento laboratorial para detecção do(s) agente(s), além da visualização dos aspectos microscópicos.

A granja 2 não teve animais enviados ao abate em frigorífico sob inspeção no período analisado. Então foram colhidas 145 amostras de pulmões e linfonodos mediastínicos de suínos oriundos da Granja 1, 3 e 4, sendo que desse total, todas as amostras foram encaminhadas para análise bacteriológica, 135 delas para a análise histopatológica e 115 (todas as amostras da Granja 4) foram submetidas a técnica de PCR. As informações referentes ao número de amostras, a data de colheita de pulmão e linfonodos, além das técnicas submetidas, estão apresentadas no Quadro 4.



Figura 3 - Colheita dos fragmentos de pulmão e linfonodos mediastínicos no frigorífico 1.

Quadro 4 - Granjas, número de amostras (pulmão/linfonodo) colhidas, data da colheita no frigorífico/matadouro e técnicas laboratoriais utilizadas – São Paulo, 2015.

Granja	Número de amostras	Técnicas submetidas	Data da colheita
Granja 1	10	Cultivo Microbiológico	28/04/2014
Granja 2	Não houve colheita de órgãos		
Granja 3	20	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	11/06/2014
Granja 4	17	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	07/07/2014
	21	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	28/07/2014
	19	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	22/09/2014
	40	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	22/10/2014
	18	Cultivo Microbiológico, Histopatológico e PCR	22/01/2015
TOTAL	145		

Na ausência do App, e levando em consideração a importância que o diagnóstico diferencial representa, objetivou-se testar também agentes bacterianos cujas lesões macroscópicas poderiam ser confundidas com lesões ocasionadas por essa bactéria. Nesse caso, foram utilizadas técnicas moleculares, sorológicas, isolamento bacteriano e histopatológico para encontrar os agentes envolvidos no surgimento de lesões pulmonares observadas no abate.

3.3.3. Locais do processamento das amostras

Quanto ao local de processamento das amostras, as técnicas foram realizadas em três laboratórios do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo. A sorologia foi realizada no Laboratório de Doenças de Suínos Washington Sugay (LDSWS), o histopatológico no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP), o isolamento bacteriano, bem como a multiplex PCR, no Laboratório de Bacteriologia Geral (LBG), e o nested PCR no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução (LDBR). O Quadro 5 mostra os laboratórios, as técnicas realizadas, bem como o número de amostras processadas em cada unidade.

Quadro 5 - Amostras relacionadas ao local de processamento e técnica laboratorial utilizada - São Paulo, 2015.

Laboratório do Instituto Biológico/SP	Técnica Laboratorial	Número de amostras processadas
Laboratório de Doenças de Suínos Washington Sugay (LDSWS)	Análise sorológica (ELISA)	192 amostras de soro
Laboratório de Anatomia Patológica (LAP)	Histopatológico	135 amostras
Laboratório de Bacteriologia Geral (LBG)	Cultivo bacteriano	145 amostras
	Multiplex PCR	115 amostras
Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução (LDBR)	Nested-PCR	115 amostras

3.4. SOROLOGIA (ELISA)

3.4.1. Sorologia para *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Objetivando realizar uma investigação epidemiológica por meio da sorologia (ELISA), foi colhido o sangue de 55 suínos no início da terminação e de 137 animais no final da terminação.

Do total de 192 animais, 70 foram colhidos em granjas por punção da veia cava cranial utilizando agulhas e seringas estéreis. E o restante, 122 animais, a colheita de sangue foi realizada no frigorífico/matadouro.

Após a chegada do material sanguíneo no laboratório de Doenças de Suínos Washington Sugay (LDSWS), foi feita a centrifugação do material e a dessora, os soros foram armazenados em microtubos de 1,5 mL e mantidos a -20°C até realização do teste de ELISA.

O *kit* de diagnóstico utilizado foi IDEXX® APP-ApxIV Teste Ab, que detecta anticorpos contra App, em soro e plasma de suínos, independente do sorotipo desse agente. Há detecção dos anticorpos exclusivamente para a toxina ApxIV, a única toxina comum a todos os sorotipos de App. Esse *kit* permite discriminar animais vacinados (não reagente) a partir de animais infectados (reagente). O protocolo, bem como o princípio da técnica encontram-se dispostos no Anexo 3.

3.5. ANATOMOPATOLÓGICO

3.5.1. Análise macroscópica

Foram submetidos à análise macroscópica, nos frigoríficos e no matadouro, os pulmões e linfonodos de todos os animais do lote que estavam sendo abatidos, totalizando uma análise de 135 amostras. Um lote de suínos foi marcado com brincos, e outros 5 lotes os animais foram identificados por marcação australiana, permitindo assim, ter uma rastreabilidade entre o sangue e órgão colhido do mesmo animal. Preconizou-se observar o aspecto que o pulmão apresentava, a coloração do mesmo, presença de aderência da pleura na parede costal, presença de edema e se havia linfonodos reativos e de coloração alterada.

3.5.2. Corte de pulmões e linfonodos fixados em formol 10% tamponado

Após a fixação das amostras de pulmão/linfonodo em formalina 10% tamponada, que deve ser deixado no mínimo por três dias, os materiais foram cortados em fragmentos menores em fluxo laminar com exaustão forçada, dispostos em cassetes histológicos devidamente identificados e submetidos a exames histopatológicos no Laboratório de Anatomia Patológica (LAP).

É importante salientar que a análise descrita se refere ao fragmento de pulmão e linfonodo colhido, geralmente a parte lesionada, não ao órgão inteiro.

3.5.3. Desidratação, diafanização e emblocagem em parafina das amostras de pulmões e linfonodos

A histotécnica (desidratação, diafanização, emblocagem em parafina, microtomia e coloração por hematoxilina/eosina) foi realizada segundo o protocolo descrito por Prophet et al. (1995), presente no Manual de Métodos Histotecnológicos do Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos (AFIP).

A descrição das patologias empregou conhecimentos morfológicos macroscópicos e microscópicos descritos em literatura de referência na área (SOBESTIANSKY, 1999; JONES et al., 2000; McGAVIN; ZACHARY, 2007).

Os fragmentos de pulmão e linfonodo dispostos em cassetes e emergidos no formol foram submetidos a um protocolo de desidratação utilizando soluções de álcool etílico em concentrações crescentes, além de serem colocados na presença do xilol para diafanização, e após serem embebidos por parafina (Quadro 6).

Depois de realizado esse protocolo com duração de cerca de 12,5 horas, os cassetes foram retirados do histotécnico e na inclusora de parafina foram emblocados em moldes de aço inox com parafina a 63°C.

Quadro 6 - Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina, modificado de Prophet et al. (1995).

Reagente	Tempo
Formol	2h
Álcool70%	1h
Álcool80%	1h
Álcool 95% I	0,5h
Álcool 95% II	0,5h
Álcool Absoluto I	1h
Álcool Absoluto II	1h
Xilol I	1h
Xilol II	1h
Xilol III	1h
Parafina 63°C I	1h
Parafina 63°C II	1,5h
Total: 12,5h	

3.5.4. Preparo das lâminas histológicas para coloração por Hematoxilina-Eosina (HE)

O tecido que foi emblocado em parafina foi cortado em micrótomo (3 µm de espessura), estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina.

Em seguida, a lâmina foi colocada em estufa 63°C *overnight* e após foi submetida a um protocolo de desparafinização (xilol), lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidro-alcoólicas, coloração pela HE, desidratação em alcoóis e diafanização em xilol (Quadro 7).

Para a montagem da lâmina e lamínula foi empregada a resina sintética Entellan (Merck®).

Quadro 7 - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido de pulmão e linfonodo de suínos, modificado de Prophet et al. (1995).

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	30 segundos
Água corrente	Lavar 15 minutos em água corrente
Eosina	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

3.5.5. Análise microscópica

Após todo o processo histopatológico descrito acima, as lâminas devidamente identificadas foram analisadas em microscópio óptico comum.

3.6. CULTIVO BACTERIANO

3.6.1. Amostras

O isolamento bacteriano foi feito a partir de amostras de pulmão e linfonodos oriundas de três granjas (Granja 1, 3 e 4), em busca de *Streptococcus* sp, sendo analisadas 145 amostras.

Nos frigoríficos e no matadouro, amostras de pulmão, pleura e linfonodos foram colhidos e acondicionados em recipientes estéreis tipo coletor universal, sendo mantidos em caixa isotérmica com gelo reciclável, até a chegada ao Laboratório de Bacteriologia Geral (LBG), local onde os materiais foram processados.

3.6.2. Processamento das amostras

Para isolamento e identificação bioquímica, os órgãos colhidos (pulmões e linfonodos) em frigorífico/matadouro foram suspensos em solução salina 0,85% estéril, e 1mL desse conteúdo foi adicionado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para enriquecimento da amostra. Um volume de 10µL da suspensão foram semeados em ágar sangue de carneiro 5% e incubados por 48 horas a 37°C.

Após o período de incubação, havendo proliferação bacteriana neste meio, foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, forma, coloração, presença e tipo de hemólise.

A seguir, realizou-se a bacterioscopia, corando-se pelo método de Gram esfregaços das diferentes colônias, onde ao microscópio foram observadas a morfologia, a disposição das células e as características tintoriais ao Gram (bactérias Gram negativas ou Gram positivas) (QUINN et al., 2005).

As espécies bacterianas foram identificadas de acordo com Quinn et al. (2005) e Koneman et al. (2008) através de provas específicas para cada agente.

É importante salientar que o isolamento de *Streptococcus* sp foi realizado somente a nível de gênero, não tendo havido identificação a nível de espécie.

3.7. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

3.7.1. Processamento das amostras

As amostras pulmões e linfonodos que foram submetidas a técnica de PCR foram apenas dos suínos da Granja 4 (115 animais). Essas amostras colhidas no matadouro foram acondicionadas em recipientes estéreis tipo coletor universal e mantidas em gelo reciclável até chegarem ao Laboratório de Bacteriologia Geral (LBG), onde foram processadas.

Um fragmento de cada órgão foi separado, todos identificados por número do animal em ordem da colheita, e esses fragmentos foram suspensos em solução salina 0,85% e macerados manualmente. Desse macerado foi retirado o necessário para o isolamento bacteriano (procedimento descrito no item 3.6) e também foi retirado 1,5mL dessa solução, armazenado em microtubo, o qual ficou mantido a -20°C até o momento de fazer o processo da extração do DNA.

Como uma forma de buscar saber quais os agentes envolvidos nas lesões encontradas ao abate (agentes diferenciais), e que possivelmente não seriam o App, preconizou-se realizar a multiplex PCR para os importantes agentes bacterianos encontrados em doenças respiratórias de suínos: *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis*. Além de também realizar a Nested PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3.7.2. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de pulmão e linfonodos macerados previamente em solução salina 0,85%, sendo utilizado o kit comercial Quick-gDNA™ MiniPrep w/ Zymo-Spin IIN Columns (Uncapped).

3.7.3. Beta actina (β -actina)

A β -actina é uma proteína com importantes funções celulares que vem sendo utilizada como gene de controle endógeno nas análises da PCR, aumentando assim a confiabilidade das análises.

Dessa forma, anteriormente ao teste das amostras para os agentes definidos, preconizou-se confirmar a extração de DNA através da PCR para o gene da β -actina.

Para isso, seguiu-se o protocolo descrito por Hui (2004), com a utilização de primers específicos para a espécie suína (Quadro 8).

Quadro 8 - Primers utilizados para a PCR de B-actin (endógeno) em amostras de suínos.

Nome	Sequência (5' -> 3')	Tamanho do produto (pb)
Actin F	TGAGACCTTCAACACGCC	745
Actin R	ATCTGCTGGAAGGTGGAC	

Para o ensaio da PCR, 2,5 µL de amostra de DNA extraído foram adicionados em 22,5µL de Mix da PCR, contendo 1,25 U Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 0,75mM de MgCl₂; 10 pmol de cada primer e água ultrapura q.s.p. 25 µL (Quadro 9). Como controle positivo utilizou-se amostra sabidamente positiva para *Mycoplasma hyopneumoniae* e como controle negativo foi utilizado água ultra-pura.

Quadro 9 - Componentes e concentrações da PCR para β-actina (endógeno).

COMPONENTES DA REAÇÃO		CONCENTRAÇÃO FINAL
Reagentes (Mix)	Nuclease free water	q.s.p
	dNTP 1,25 mM	200 µM
	1X PCR Buffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,4 50 mM KCl
	MgCl ₂	0,75mM
	Primer Actin F	10 pmol
	Primer Actin R	10 pmol
	Taq DNA Polimerase	1,25 U
Amostra de DNA		2,5 µL

O processo de amplificação foi realizado em termociclador, com as seguintes condições: 95°C por 5 minutos; 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C durante 45 segundos e 72°C por 45 segundos; para a extensão final foram 72°C por 5 minutos (Quadro 10).

Quadro 10 - Processo de amplificação das amostras, com informações das condições de temperatura, tempo e número de ciclos, para a PCR da β -actina.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	CICLO
Desnaturação inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturação	95°C	30''	39x
Hibridização	56°C	45''	
Extensão	72°C	45''	
Extensão Final	72°C	5'	1 ciclo
Mantença	4°C	Indeterminado	Hold

Após a amplificação no termociclador, foi feito eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™ (diluído 1:2). Os fragmentos amplificados foram comparados com o padrão de tamanho molecular (100bp DNA Ladder Invitrogen®) e a imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a um computador.

3.7.4. Multiplex PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae* e agentes diferenciais (*Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*)

Para detecção dos agentes, foi realizada a multiplex PCR empregando oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para cada agente, ou seja, para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AP-IVF/ AP-IVR), *Pasteurella multocida* (KMT1 T7/ KMT1 SP6) e *Haemophilus parasuis* (HPS-F/ HPS-R), que amplificam um segmento de 346, 460 e 821 pares de bases (pb), respectivamente (Quadro 11). Os primers empregados na análise de PCR foram estabelecidos por Xiao et al. (2006), Townsend et al. (1998) e Oliveira et al. (2001), e apresentados por Hričínová et al. (2010), em um trabalho de multiplex PCR.

Como controle positivo da reação foi utilizado a amostra padrão do *A. pleuropneumoniae* sorotipo I, III e Va, amostras de isolamento de colônia de *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*. A amostra negativa foi água ultra-pura.

Quadro 11 - Sequência de *primers* utilizados para a reação de multiplex PCR, para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis*.

Nome	Sequência (5' -> 3')	Tamanho do produto (pb)	Referências
AP-IVF	ATA CGG TTA ATG GCG GTA ATG G	346	Xiao et al. (2006)
AP-IVR	ACC TGA GTG CTC ACC AAC G		
KMT1 T7	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	460	Townsend et al. (1998)
KMT1 SP6	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC		
HPS-F	GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT	821	Oliveira et al. (2001)
HPS-R	GGC TTC GTC ACC CTC TGT		

Realizou-se a amplificação das amostras com a utilização de 10 µL do DNA extraído acrescido de 40 µL da mistura dos reagentes contendo 1,25 U Taq DNA polimerase, 1X PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl), 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 2 mM MgCl₂ e 30 pmol de cada *primer* e água ultrapura q.s.p. 50 µL (Quadro 12).

Quadro 12 - Componentes da reação de multiplex PCR para detecção dos agentes *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis*.

COMPONENTES DA REAÇÃO		CONCENTRAÇÃO FINAL
Reagentes (Mix)	Nuclease free water	q.s.p
	dNTP 1,25 mM	200 µM
	1X PCR Buffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM KCl
	MgCl ₂	2 mM
	Primer AP-IVF	30 pmol
	Primer AP-IVR	30 pmol
	KMT1 T7	30 pmol
	KMT1 SP6	30 pmol
	HPS-F	30 pmol
	HPS-R	30 pmol
	Taq DNA Polimerase	1,25 U
Amostra de DNA		10 µL

O processo de amplificação foi realizado em termociclador, de acordo com as seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com um ciclo a 95°C por cinco minutos, seguido de 29 ciclos de: 94°C por 30 segundos, hibridização dos primers com a temperatura de 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Depois de completados os 29 ciclos, uma etapa final consistia do aquecimento de 72°C por 7 minutos para a extensão final (Quadro 13).

Quadro 13 - Processo de amplificação do material, com informações das condições de temperatura, tempo e número de ciclos.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	CICLO
Desnaturação inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturação	94°C	30''	29x
Hibridização	58°C	30''	
Extensão	72°C	45''	
Extensão Final	72°C	7'	1 ciclo
Mantença	4°C	Indeterminado	Hold

Após a amplificação no termociclador, foi feita eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™ (diluído 1:2). Os fragmentos amplificados foram comparados com o padrão de tamanho molecular (100bp DNA Ladder Invitrogen®) e a imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a um computador.

3.7.5 Nested PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo)

Por ser um agente de grande importância na suinocultura e estar muito presente nas granjas desencadeando doença respiratória, preconizou-se buscar o Mhyo nas granjas estudadas, através da técnica de nested PCR.

Os primers externos (Mhyo A-F/Mhyo B-R) utilizados neste trabalho foram descritos por MATSSON et al. (1995) e os primers internos (Mhyo C-F/Mhyo D-R) por CALSAMIGLIA et al. (1999a). Primeiramente foi amplificado um fragmento de 649pb, e a nested PCR teve amplificação de um fragmento interno de 352pb. Os primers estão descritos no Quadro 14.

Quadro 14 - Relação dos *primers* utilizados na Nested-PCR para diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Primers		Sequência (5' -> 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Primers externos	Mhyo A-F	GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA	649pb
	Mhyo B-R	TGTGTTAGTGACTTTTGCCACC	
Primers internos	Mhyo C-F	ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT	352pb
	Mhyo D-R	GTGGACTACCAGGGTATCT	

Para a realização da PCR, a solução de reagentes do *mix* consistiu de 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®); 10 pmol de cada primer (Mhyo A-F e Mhyo B-R); 200 µM de cada dNTP; 0,75 mM de MgCl₂; 1X PCR Buffer (20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl); 5 µL de DNA extraído e água ultrapura q.s.p. 25 µL. O controle positivo foi DNA de Mhyo e negativo água ultra-pura.

Os ciclos de temperatura foram de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e meio, encerrando com aquecimento de 72°C por 5 minutos para a extensão final.

Na nested PCR, a solução de reagentes foi idêntica à PCR, substituindo-se apenas o par de primers (Mhyo C-F e Mhyo D-R) e tendo alteração da temperatura de hibridização, passando de 64°C para 60°C.

Os produtos amplificados foram visualizados por transiluminação com luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 1,3%, acrescido de brometo de etídeo a 0,5µg/mL. Os fragmentos amplificados foram comparados com o padrão de tamanho molecular (100bp DNA *Ladder* Invitrogen®) e a imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a um computador.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada na Granja 4 (115 suínos) a análise de variância considerando a infecção conjunta de *Streptococcus* sp e Mhyo, ou somente Mhyo. Foram avaliadas as variáveis zootécnicas: peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR),

associada às fontes de variação: sexo (macho e fêmea), doença (positivo ou negativo), idade (em dias) e lesões macro e microscópicas.

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se o modelo misto e para os efeitos aleatórios de lote e resíduo foi utilizando o procedimento MIXED do SAS (versão 9.3).

Quando significativa, as médias entre tratamentos foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher (i.e., a opção DIFF do comando LSMEANS). Em todas as análises a significância foi declarada à $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. SELEÇÃO DAS GRANJAS

Realizou-se a seleção de quatro granjas de suínos que apresentassem os requisitos propostos, identificadas neste trabalho como Granjas 1, 2, 3 e 4.

As granjas selecionadas possuem características diferentes com relação à localização, tipo de instalação, manejo, biossegurança e biossegurança.

Granja 1

Está localizada no município de Monte Mor/SP e possui aproximadamente 350 matrizes. A criação dos suínos é intensiva com ciclo completo. Cerca de 120 animais são enviados ao abate semanalmente. A granja adota medidas de controle e preocupação na biossegurança, com a maioria dos galpões separados para cada fase da criação (Figura 4), além da alimentação controlada (ração) que é fornecida aos animais (Figura 5). Porém, mesmo assim possui alguns problemas sanitários, como a limpeza do local interno e externo, a presença de eventuais diarreias e a fábrica de ração junto com um dos galpões de terminação (Figura 6).



Figura 4 - Estrutura interna do galpão de terminação (Granja 1).



Figura 5 - Alimentação (ração) fornecida aos animais no galpão de terminação (Granja 1).



Figura 6 - Galpões separados na Granja 1. Seta amarela: maternidade isolada da terminação. Seta vermelha: galpão com fábrica de ração e parte da terminação.

Granja 2

Está localizada no município de Embu-Guaçu/SP e há aproximadamente 100 matrizes. A criação é intensiva, possuindo uma baixa tecnificação, onde as instalações são inadequadas, com ambientes escuros, abafados e úmidos, além da presença de outras espécies de animais soltos nos galpões, como aves (Figura 7) e animais sinantrópicos. A maternidade encontra-se próxima a outras fases de criação (Figura 8), perto de machos reprodutores e animais da terminação. O manejo nutricional é deficiente, ou seja, não são utilizadas rações balanceadas, sendo que a alimentação dos animais é baseada em batata-inglesa de baixa qualidade, em processo de degradação (Figura 9 e 10). Os animais apresentam sintomatologia clínica de problema respiratório, como tosse, dificuldade respiratória e presença de suínos em posição de “cão sentado” (Figura 11).



Figura 7 - Galpão de terminação com ambiente escuro e com condições sanitárias precárias. Círculos: presença de aves no local (Granja 2).



Figura 8 - Galpão de maternidade e terminação (Granja 2)



Figura 9 - Alimentação disponibilizada aos suínos (batata aquecida). Caldeirão de aquecimento das batatas (Granja 2).



Figura 10 - Alimentação disponibilizada aos suínos (batata aquecida). Seta amarela: local de armazenamento e mistura das batatas. Seta vermelha: Caldeirão de aquecimento das batatas.



Figura 11 - Animal com sintomatologia clínica de doença respiratória: tosse, dispneia e posição de “cão sentado” no galpão de terminação (Granja 2).

Granja 3

Está localizada no município de Ibiúna/SP, com cerca de 80 matrizes. Não adota um manejo sanitário adequado, a criação é intensiva e a maternidade está localizada junto a terminação. Um problema encontrado é a aquisição de suínos de diversas propriedades diferentes, o que possibilita a entrada de patógenos na granja. A ração é formulada com produtos industrializados e há a presença de criações de outras espécies ao redor dos galpões (Figura 12). Cerca de 40 animais são enviados semanalmente para o abate.



Figura 12 - Parte externa do galpão de terminação e maternidade de suínos com presença de aves no local (Granja 3).

Granja 4

Está localizada no município de Pirassununga/SP, possuindo 26 matrizes. Realiza um manejo adequado com os animais, visando o bem-estar, sendo que em algumas fases da produção os animais são criados em extensão (Figura 13). A alimentação é controlada, a limpeza e desinfecção das instalações são bem rigorosas (Figura 14) possuindo áreas delimitadas nas diferentes fases de criação (Figura 15). Cerca de 20 animais são enviados quinzenalmente para o abate. Há controle zootécnico na granja e os animais são vacinados para Pneumonia Enzoótica dos Suínos – *Mycoplasma hyopneumoniae* (Respisure ONE Mycoplasma Lab. Zoetis), Ileíte (Enterisol-Lab. Boehringer Ingelhei), Paratifo e Erisipela (Suiven Lab. Verconfarma) e Parvovirose (Farrowsure (GOLD) Lab. Zoetis).



Figura 13 - Fêmea reprodutora em gestação, criada na forma extensiva, objetivando o bem-estar animal (Granja 4).



Figura 14 - Baia com vazio sanitário.(Granja 4).



Figura 15 - Baia com animais de terminação. (Granja 4).

4.2. SOROLOGIA

Foi verificado pela sorologia um total de 192 amostras de soros de suínos, oriundos de quatro granjas do Estado de São Paulo. Desse total, 4 (2,09%) foram reagentes no teste de ELISA para App, sendo o restante, 188 (97,91%), não reagentes para o agente (Tabela 1).

A Granja 1 (42 soros) e a Granja 4 (115 soros), não apresentaram nenhum resultado reagente. Entretanto, na Granja 2 (20 soros) e Granja 3 (15 soros), obteve-se 3 e 1 animal reagentes, respectivamente.

É importante observar que houve diferença entre a presença do anticorpo com relação ao *status* sanitário da granja analisada.

Tabela 1 - Resultados obtidos na sorologia para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, encontrados em suínos de quatro diferentes granjas do Estado de São Paulo – São Paulo, 2015.

Granja	Sorologia		Total (n/%)
	Não Reagente (n/%)	Reagente (n/%)	
Granja 1	42 (21,87)	0 (0)	42 (21,87)
Granja 2	17 (8,85)	3 (1,57)	20 (10,42)
Granja 3	14 (7,30)	1 (0,52)	15 (7,82)
Granja 4	115 (59,89)	0 (0)	115 (59,89)
TOTAL	188 (97,91)	4 (2,09)	192 (100,00)

4.3. ANATOMOPATOLÓGICO

4.3.1 Análise macroscópica

Os pulmões e linfonodos de suínos oriundos das diferentes granjas foram analisados ao abate e foram visualizadas diversas lesões características de doença respiratória.

Primeiramente, é importante ter como referência o que é dito como normal em se tratando de estruturas anatômicas. Nas Figuras 16, 17 e 18, podem ser observadas a carcaça, pulmão e linfonodo mediastínico de suíno, respectivamente, sendo que os mesmos estão com aspecto macroscopicamente normal.



Figura 16 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Carcaça de suíno sem lesão na parede costal.



Figura 17 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Pulmão de suíno com aspecto aparentemente normal.



Figura 18 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Linfonodo mediastínico de suíno com aspecto aparentemente normal.

Dessa forma, entre as lesões macroscópicas encontradas, pode-se citar aderência da pleura na carcaça (Figuras 19 e 21) e os respectivos pulmões com perda de parênquima pulmonar e pleura (Figuras 20 e 22), observou-se também presença de nódulos (Figura 23), pulmão marmorizado com alteração na coloração e pulmão com lobos atrofiados. Foi também observado o órgão edemaciado, com aspecto esponjoso (enfisematoso) e marcas das costelas no parênquima pulmonar (Figura 24), além de pericardite (Figura 25). Havia linfonodos que estavam reativos, hemorrágicos e de coloração alterada (Figura 26).



Figura 19 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Carcaça de suíno com tecido pulmonar (pleura) aderido a parede costal.



Figura 20 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Pulmão de suíno com ausência de pleura, pela aderência na carcaça.



Figura 21 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Carcaça de suíno com tecido pulmonar (pleura) aderido a parede costal.



Figura 22 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Pulmão de suíno com ausência de fragmentos de pleura, presença de edema e hemorragia.

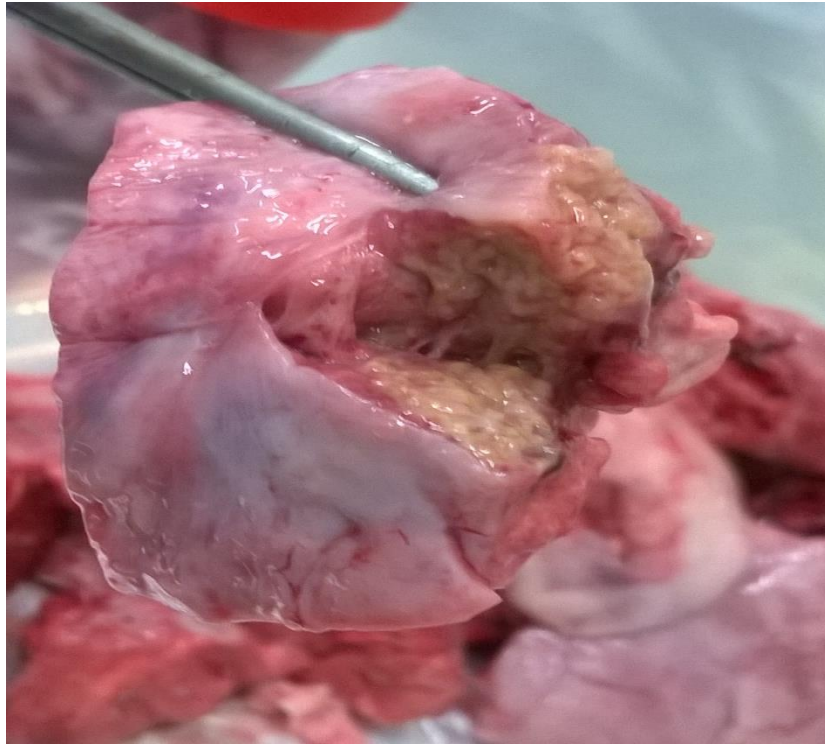


Figura 23 - Animal da Granja 3 (Frigorífico 2). Fragmento de pulmão de suíno. Superfície de nódulo pulmonar. Área de necrose tecidual.



Figura 24 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Fragmento de pulmão de suíno. Superfície pulmonar marcada pelas costelas.



Figura 25 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Coração de suíno. Pericardite.



Figura 26 - Animal da Granja 4 (Matadouro). Linfonodo mediastínico de suíno reativo e hemorrágico.

As lesões macroscópicas pulmonares observadas nos animais da Granja 4, e que foram tabuladas em função da positividade do isolamento bacteriano para o *Streptococcus* sp e nested PCR para o Mhyo, demonstram que as lesões mais frequentes nas 17 amostras positivas para *Streptococcus* sp associado a Mhyo, foram marmoreio (6,25%), pulmão friável (2,50%), pálido (2,50%), hemorragia (1,25%), edema (1,24%) e petéquias (0,63%) Para as 113 amostras que foram positivas para Mhyo, as lesões observadas foram marmoreio (45,00%), edema (20,62%), hemorragia (8,75%), pulmão friável (8,12%), pálido (7,50%), enfisematoso (4,38%), atrofia (2,50%), petéquias (1,89%), aderência de pleura (0,62%) e pericardite (0,62%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Lesões macroscópicas pulmonares encontradas nos animais da Granja 4 com relação ao isolamento de *Streptococcus* sp e nested PCR para Mhyo - São Paulo, 2015.

Lesões Macroscópicas Pulmonares	<i>Streptococcus</i> sp e Mhyo Total (%)	Somente Mhyo Total (%)	Total (%)
Marmoreio	10 (6,25)	62 (38,75)	72 (45,00)
Edema	2 (1,24)	31 (19,38)	33 (20,62)
Hemorragia	2 (1,25)	12 (7,50)	14 (8,75)
Pulmão friável	4 (2,50)	9 (5,62)	13 (8,12)
Pálido	4 (2,50)	8 (5,00)	12 (7,50)
Textura pulmonar alterada (enfisematoso)	0 (0,00)	7 (4,38)	7 (4,38)
Atrofia	0 (0,00)	4 (2,50)	4 (2,50)
Petéquias	1 (0,63)	2 (1,26)	3 (1,89)
Aderência de pleura	0 (0,00)	1 (0,62)	1 (0,62)
Pericardite	0 (0,00)	1 (0,62)	1 (0,62)
Total			160 (100)

4.3.2. Análise microscópica

Primeiramente, como mostrado macroscopicamente, é interessante apresentar numa visão microscópica, um fragmento de pulmão normal, onde a pleura apresenta-se íntegra e as estruturas pulmonares normais (Figura 27).

As alterações encontradas no fragmento na análise microscópica foram lesões condizentes com problemas respiratórios, tanto em pulmões, como nos linfonodos mediastínicos.

As principais lesões pulmonares caracterizaram-se pela presença de focos de infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (Figuras 29 e 32) e intersticial (Figuras 29, 31, 33 e 34), espessamento da pleura visceral (Figuras 29, 31 e 32) e interlobular (Figura 34), áreas de enfisema (Figura 34), septos alveolares espessados (Figuras 31, 32 e 34), presença de edema pleural, alveolar (Figura 31, 33 e 34) e nos bronquíolos, além de focos hemorrágicos e macicez pulmonar (Figura 34).

Além disso, foi observada fibrose interlobular e presença de fibrina intersticial no parênquima alveolar (Figura 34), além de neutrófilos no lúmen dos bronquíolos (Figuras 30 e 32).

Nos pulmões que macroscopicamente apresentavam nódulos, na histopatologia foi observado focos de granulomas no parênquima (Figura 28a) formado por áreas de necrose com presença de neutrófilos, infiltrado mononuclear, e macrófagos, circundados por cápsula de tecido conjuntivo (Figuras 28a-b).

Havia linfonodos com reação linfoide folicular (Figuras 35 e 36) e com áreas hemorrágicas (Figura 36).

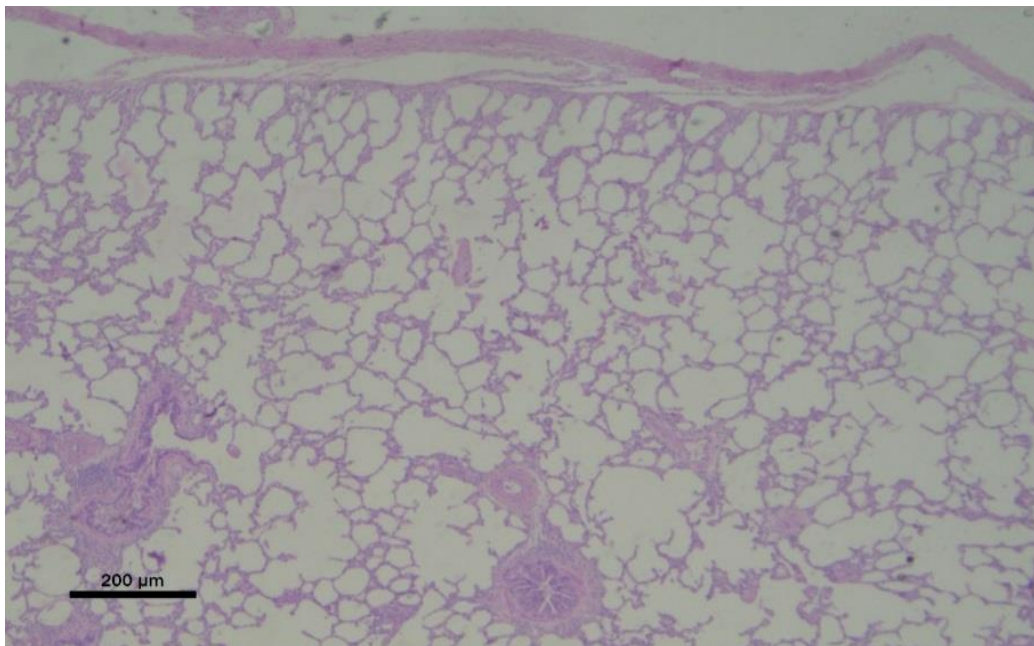


Figura 27 - Suíno. Pulmão normal. Controle negativo. Epitélio bronquiolar íntegro, alvéolos normais, pleura com espessura regular (Granja 3). HE.40x.

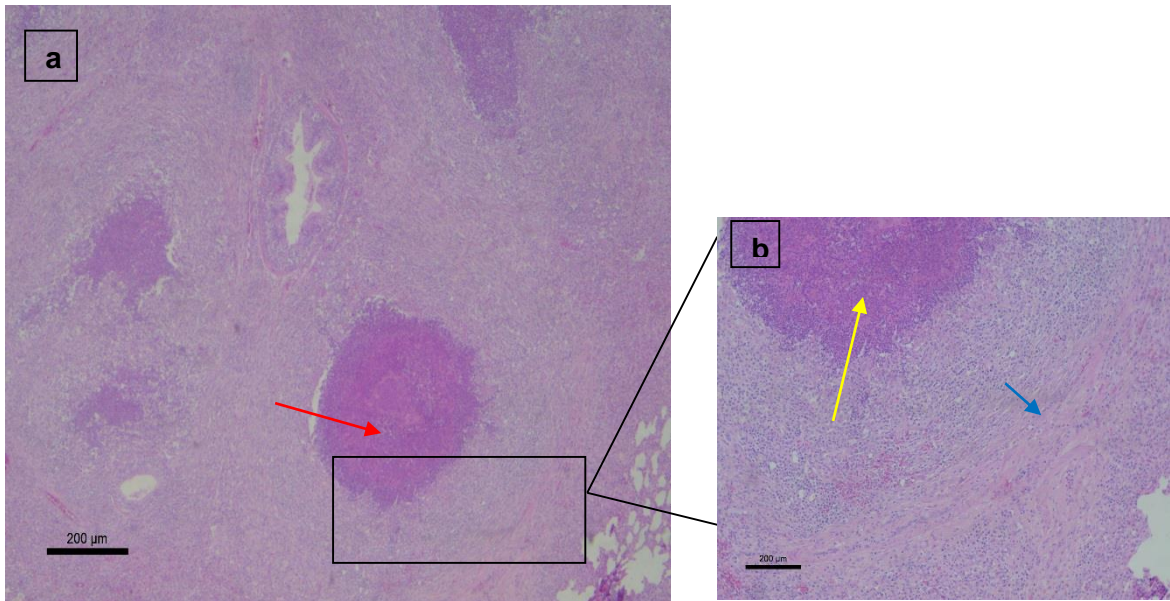


Figura 28 - a: Suíno. Pulmão. Focos de granuloma no parênquima (seta vermelha). H.E.40x. **b:** Nódulo formado por áreas de necrose, com presença de neutrófilos, infiltrado mononuclear e macrófagos (seta amarela), circundados por cápsula de tecido conjuntivo (seta azul) (Granja 3). HE.40x. Isolamento bacteriano: não foi possível por haver contaminantes.

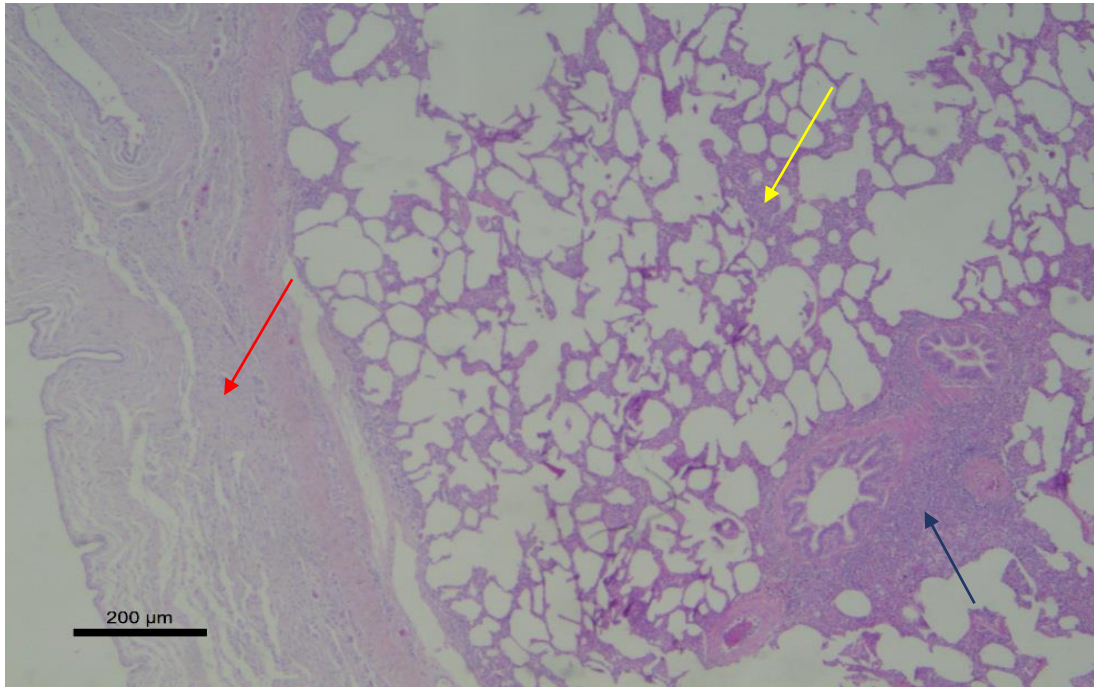


Figura 29 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral (seta vermelha). Infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (seta azul) e no interstício (seta amarela) (Granja 3). HE.40x. Isolamento bacteriano: *Streptococcus* sp

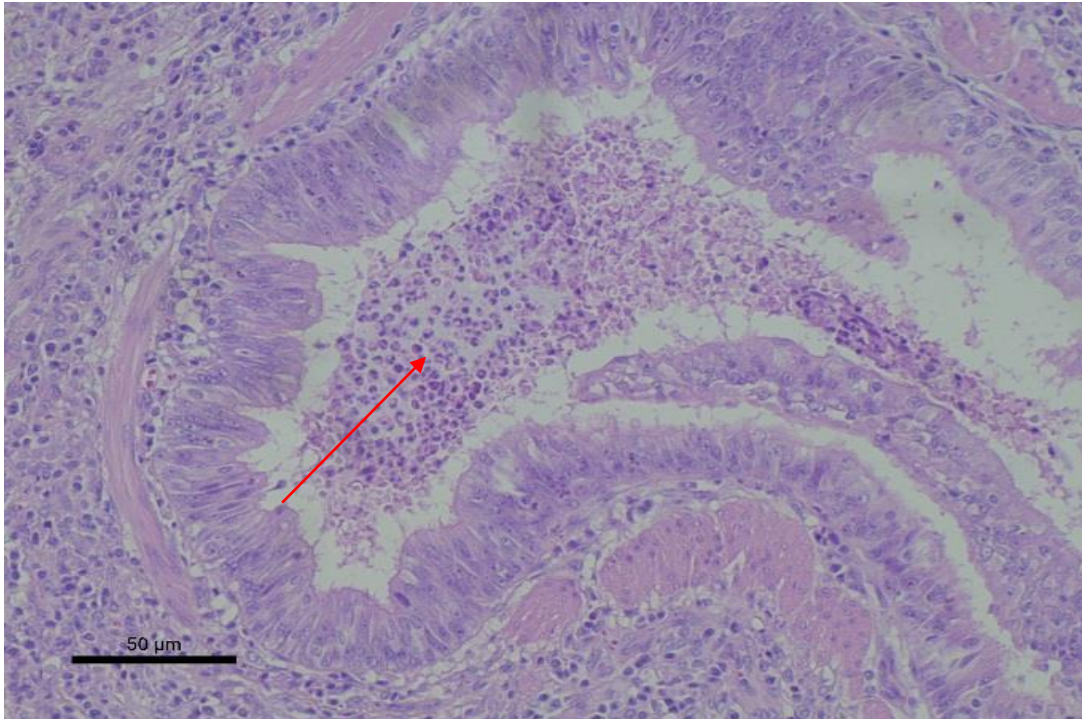


Figura 30 - Suíno. Pulmão. Presença de neutrófilos no lúmen dos bronquíolos (seta vermelha) (Granja 3) HE.100x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

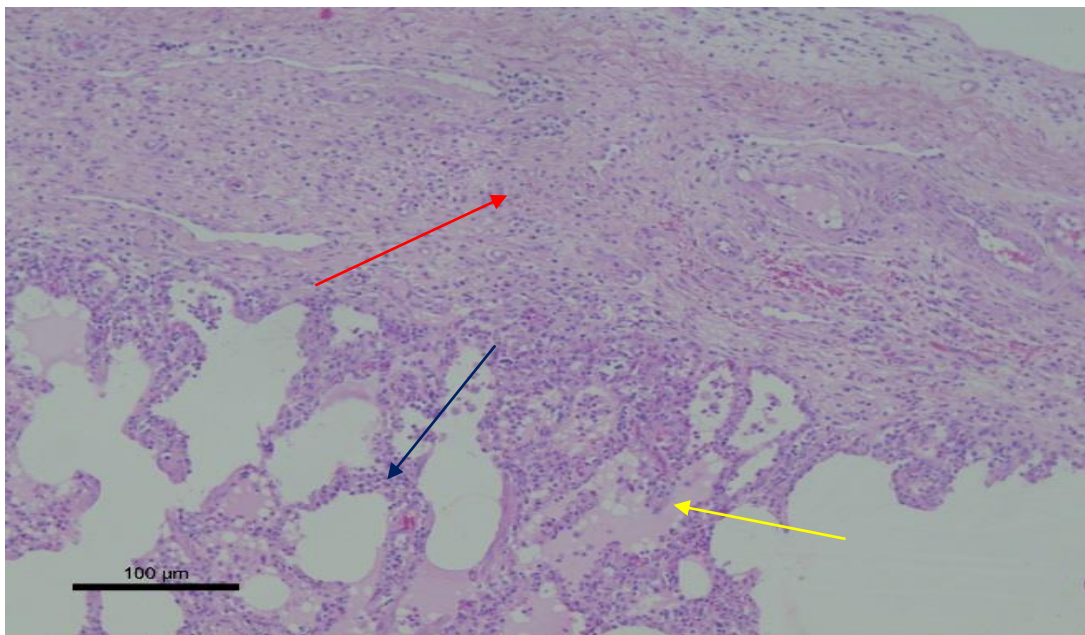


Figura 31 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral, com infiltrado inflamatório mononuclear (seta vermelha). Edema alveolar (seta amarela) e infiltrado mononuclear intersticial (seta azul) (Granja 3). HE.100x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

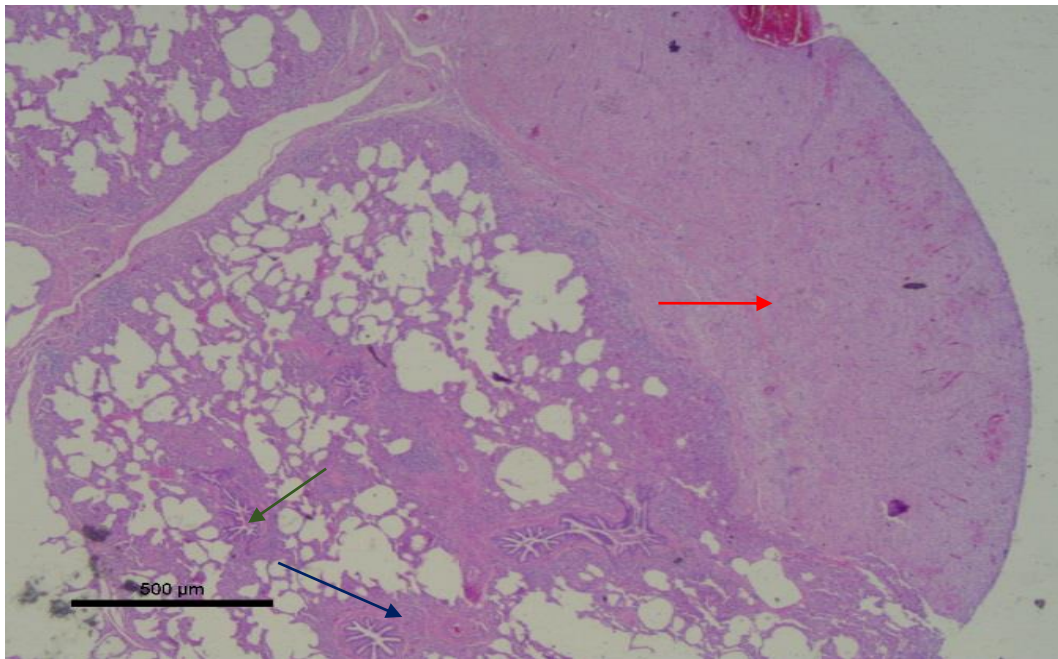


Figura 32 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento da pleura visceral (seta vermelha). Intenso infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (seta azul). Presença de neutrófilos no lúmen dos bronquíolos (seta verde) (Granja 3). HE.25x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

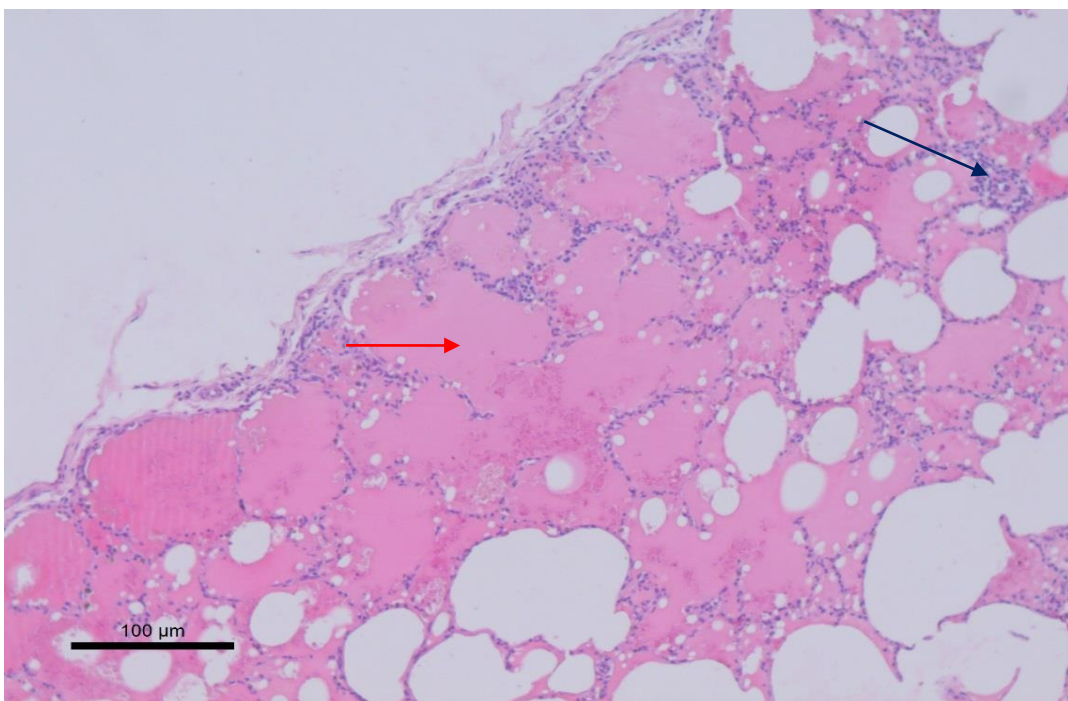


Figura 33 - Suíno. Pulmão. Intenso edema alveolar (seta vermelha) e discreto infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (seta azul) (Lote 5/Granja 4). HE.100x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

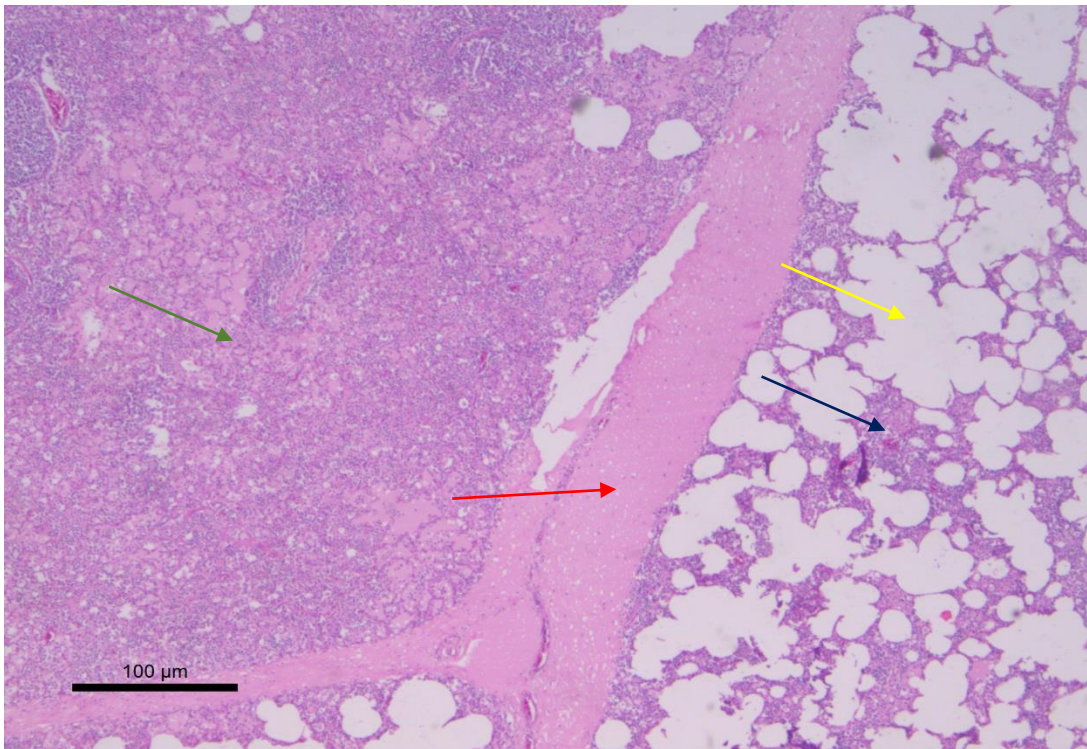
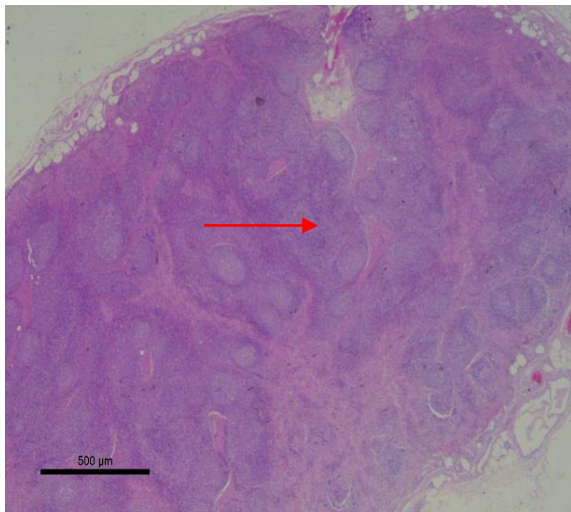


Figura 34 - Suíno. Pulmão. Intenso espessamento e presença de fibrina na pleura interlobular (seta vermelha). Intenso infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (seta azul) Área de macicez pulmonar com edema e fibrina intersticial (seta verde). Áreas de enfisema (seta amarela) (Lote 4/Granja 4). HE.40x Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).



Fnigura 36 - Suíno. Linfonodo mediastínico. Reação linfoide folicular (seta vermelha) (Granja 3). HE.25x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

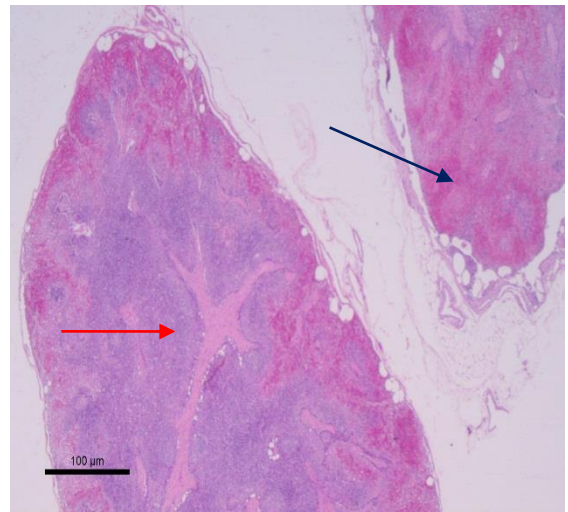


Figura 35 - Suíno. Linfonodo mediastínico. Reação linfoide folicular (seta vermelha) e focos hemorrágicos (seta azul) (Lote 5/Granja 4). HE.25x. Isolamento bacteriano: contaminantes (nada representativo).

As lesões microscópicas pulmonares tabuladas em função da positividade do isolamento bacteriano para o *Streptococcus* sp e nested PCR para o Mhyo demonstram que as lesões mais frequentes nas 17 amostras positivas para *Streptococcus* foram: espessamento da pleura interlobular (1,64%), fibrina intersticial (1,64%), espessamento dos septos alveolares (1,64%), infiltrado mononuclear intersticial (1,45%), infiltrado mononuclear peribronquiolar (1,35%), enfisema (1,25%), espessamento da pleura visceral (1,16%), edema (1,16%), debris celulares no lúmen dos bronquíolos (0,67%), neutrófilos no parênquima e no lúmen dos bronquíolos (0,58%), macicez pulmonar (0,58%), macrófagos espumosos (0,58%) e hemorragia intersticial (0,38%). Para as 113 amostras positivas para Mhyo foram: fibrina intersticial (10,33%), espessamento da pleura interlobular (10,42%), espessamento dos septos alveolares (10,23%), infiltrado mononuclear intersticial (10,23%), infiltrado mononuclear peribronquiolar (10,04%), enfisema (9,07%), espessamento da pleura visceral (7,63%), debris celulares no lúmen dos bronquíolos (7,24%), edema (6,66%), macicez pulmonar (5,60%), macrófagos espumosos (4,63%), neutrófilos no parênquima e no lúmen dos bronquíolos (4,44%), e hemorragia intersticial (3,47%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Lesões microscópicas pulmonares encontradas nos animais da Granja 4 e isolamento de *Streptococcus* sp e nested PCR para Mhyo – São Paulo, 2015.

Lesões Microscópicas Pulmonares	<i>Streptococcus</i> sp e Mhyo Total (%)	Somente Mhyo Total (%)	Total (%)
Espessamento da pleura interlobular	17 (1,64)	91 (8,78)	108 (10,42)
Fibrina intersticial	17 (1,64)	90 (8,69)	107 (10,33)
Espessamento dos septos alveolares	17 (1,64)	89 (8,59)	106 (10,23)
Infiltrado mononuclear intersticial	15 (1,45)	91 (8,78)	106 (10,23)
Infiltrado mononuclear peribronquiolar	14 (1,35)	90 (8,69)	104 (10,04)
Enfisema	13 (1,25)	81 (7,82)	94 (9,07)
Espessamento da pleura visceral	12 (1,16)	67 (6,47)	79 (7,63)
Debris celulares no lúmen dos bronquíolos	7 (0,67)	68 (6,57)	75 (7,24)
Edema	12 (1,16)	57 (5,50)	69 (6,66)
Macicez pulmonar	6 (0,58)	52 (5,02)	58 (5,60)
Macrófagos espumosos	6 (0,58)	42 (4,05)	48 (4,63)
Neutrófilos no parênquima e lúmen bronquíolos	6 (0,58)	40 (3,86)	46 (4,44)
Hemorragia intersticial	4 (0,38)	32 (3,09)	36 (3,47)

4.4. CULTIVO BACTERIANO

De forma geral, o isolamento bacteriano foi realizado de amostras advindas de três granjas (a Granja 2 não teve colheita de órgãos), sendo que foram testadas 145 amostras de pulmão e linfonodos mediastínicos. Entretanto, em 12 casos, a tentativa de isolamento de bactérias foi somente do pulmão, por não ter sido possível a colheita do linfonodo mediastínico. Na Tabela 4 é possível observar, no geral, todas as bactérias que foram isoladas.

Na Tabela 5, é possível visualizar as bactérias que foram encontradas em cada granja individualmente. Isso permite observar quais as granjas mais problemáticas, que necessitam de maior cuidado sanitário e quais são os patógenos envolvidos.

Tabela 4 - Total de bactérias encontradas no isolamento bacteriano, de amostras de pulmão e linfonodo de três granjas do Estado de São Paulo - São Paulo, 2015.

Granja	Isolamento Bacteriano	Total Número de isolados (%)
	Bactérias encontradas	
Granja 1	<i>Bacillus</i> sp	60 (28,85)
	<i>Staphylococcus intermedius</i>	43 (20,67)
	<i>Escherichia coli</i>	30 (14,42)
	<i>Streptococcus</i> sp	24 (11,54)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	19 (9,13)
	<i>Enterobactéria</i>	13 (6,25)
Granja 3	Contaminação por <i>Proteus</i>	6 (2,88)
	Gram negativo não fermentador	5 (2,40)
Granja 4	<i>Serratia liquefaciens</i>	2 (0,96)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (0,96)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (0,48)
	<i>Trueperella pyogenes</i>	1 (0,48)
	<i>Morganella morganii</i>	1 (0,48)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,48)
TOTAL		208 (100)

Tabela 5 - Isolados bacterianos obtidos conforme a granja estudada - São Paulo, 2015.

Granja	Número de amostras (pulmão e linfonodo)	Número de cultivos	Bactérias isoladas	Total: Número de isolados (%)
Granja 1	1 a 9 (pool)	2	<i>Staphylococcus intermedius</i>	2 (28,57)
			<i>Bacillus</i> sp	2 (28,57)
	10 a 14 (pool)		<i>Pantoea agglomerans</i>	2 (28,57)
			<i>Enterobactéria</i>	1 (14,29)
TOTAL			7 (100)	
Granja 2		Não foi feita a colheita de órgãos		
Granja 3	22*	22	<i>Bacillus</i> sp	12 (27,27)
			<i>Pantoea agglomerans</i>	12 (27,27)
			Streptococcus sp	7 (15,91)
			<i>Staphylococcus intermedius</i>	6 (13,63)
			Contaminação por <i>Proteus</i> (Impossibilitou fazer a identificação das colônias que haviam crescido no ágar)	6 (13,63)
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (2,29)
TOTAL			44 (100)	
Granja 4	Lote 1 Lote 2 Lote 3 Lote 4 Lote 5	17 21 19 40 18	<i>Bacillus</i> sp	46 (29,30)
			<i>Staphylococcus intermedius</i>	35 (22,29)
			<i>Escherichia coli</i>	30 (19,11)
			Streptococcus sp	17 (10,83)
			<i>Enterobactéria</i>	12 (7,64)
			<i>Pantoea agglomerans</i>	5 (3,18)
			Gram negativo não fermentador	5 (3,18)
			<i>Serratia liquefaciens</i>	2 (1,27)
			<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (1,27)
			<i>Trueperella pyogenes</i>	1 (0,64)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0,64)			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,64)			
TOTAL			157 (100)	

* Amostras de número 6,8,9,11,15,16,17,18,19,20,21,22 não haviam linfonodos. Tentativa de isolamento somente com pulmões.

Dentre as bactérias encontradas, é importante observar que foram isoladas 24 colônias de *Streptococcus* sp (Figura 37 e 38), sendo o único agente bacteriano encontrado e que apresenta significado importante para doenças respiratórias de suínos, além de ser um dos agentes diferenciais de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



Figura 37 - Suíno. Placa ágar-sangue carneiro, com crescimento de colônias de *Streptococcus* sp isoladas de pulmão e linfonodos mediastínicos (Granja 4).

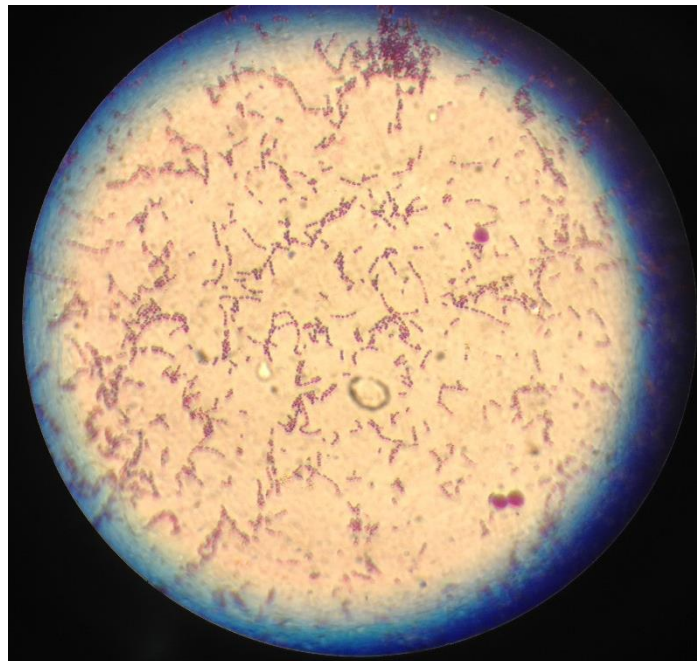


Figura 38 - Suíno. Colônias de *Streptococcus* sp encontrada em amostra de pulmão e linfonodos (Granja 4). Microscópio com objetiva de imersão (100x).

4.5. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

4.5.1 PCR para Beta actina

Foram realizados testes com todas as amostras de campo (pulmões e linfonodos) da Granja 4 (115 animais) as quais haviam sido previamente extraídas, visando verificar presença de DNA amplificável por PCR para o gene da β -actina.

De acordo com o resultado, pode-se observar que a extração das amostras foi confirmada pela presença da banda de 745 pb, indicando que o DNA foi amplificável. Na Figura 39 pode-se ter como exemplo algumas amostras do Lote 1.

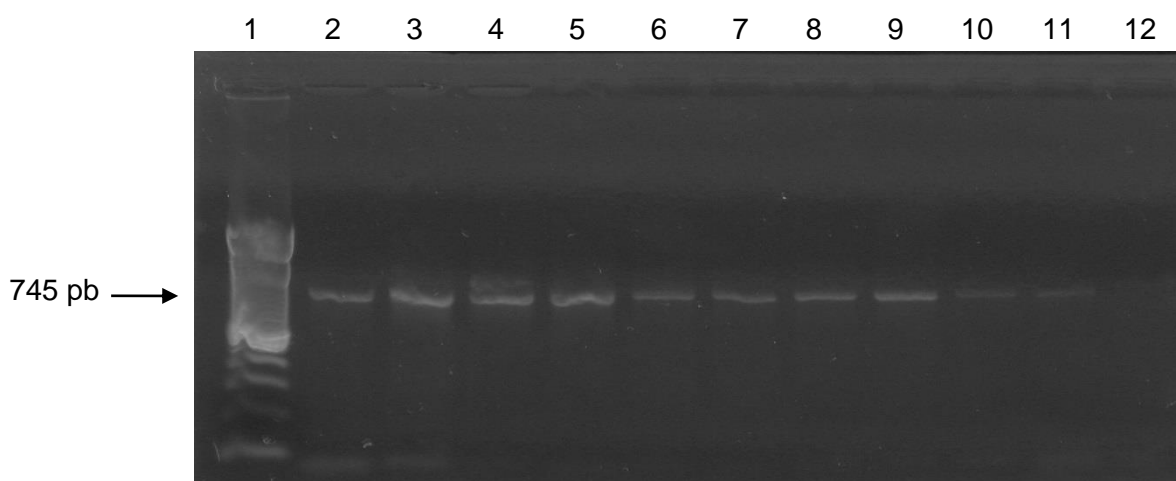


Figura 39 – Teste das amostras de campo submetidas a PCR para controle endógeno (β -actina). 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 ao 10- Amostras de campo (Lote 1/Granja 4); 11- Controle positivo (*Mycoplasma hyopneumoniae*); 12- Controle negativo (água ultra-pura) – São Paulo, 2015.

4.5.2 Multiplex PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*

A Técnica de multiplex PCR foi padronizada para os agentes: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*, utilizando os *primers* descritos no item 3.7.2.1 deste trabalho.

Inicialmente a reação foi padronizada buscando testar os controles positivos dos agentes, verificando se estavam viáveis para o uso. É importante salientar que os controles

positivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* apresentam uma amplificação de 346pb, o *Haemophilus parasuis* tem tamanho de 821 pb e *Pasteurella multocida* de 460 pb.

O resultado está representado na Figura 40, onde é identificado cada controle, com base no *Ladder* de 100 pares de base (pb) (Invitrogen®).

Todas as 115 amostras da Granja 4 foram submetidas a técnica de multiplex PCR, porém nenhuma amostra foi positiva para os agentes já mencionados. Como exemplo, podem-se observar dois géis escolhidos aleatoriamente (Figura 41 e 42), onde todas as amostras são negativas.

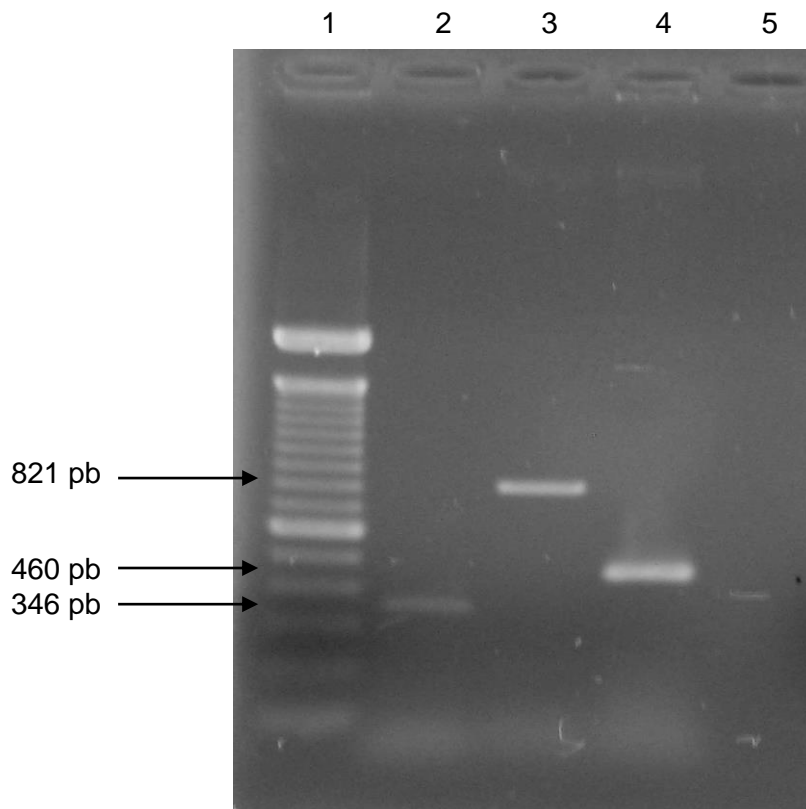


Figura 40 - Resultado do teste dos controles positivos utilizando a técnica de multiplex PCR. 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (346 pb); 3- Controle positivo *Haemophilus parasuis* (821 pb); 4- Controle positivo *Pasteurella multocida* (460 pb); 5- Controle negativo – São Paulo, 2015.

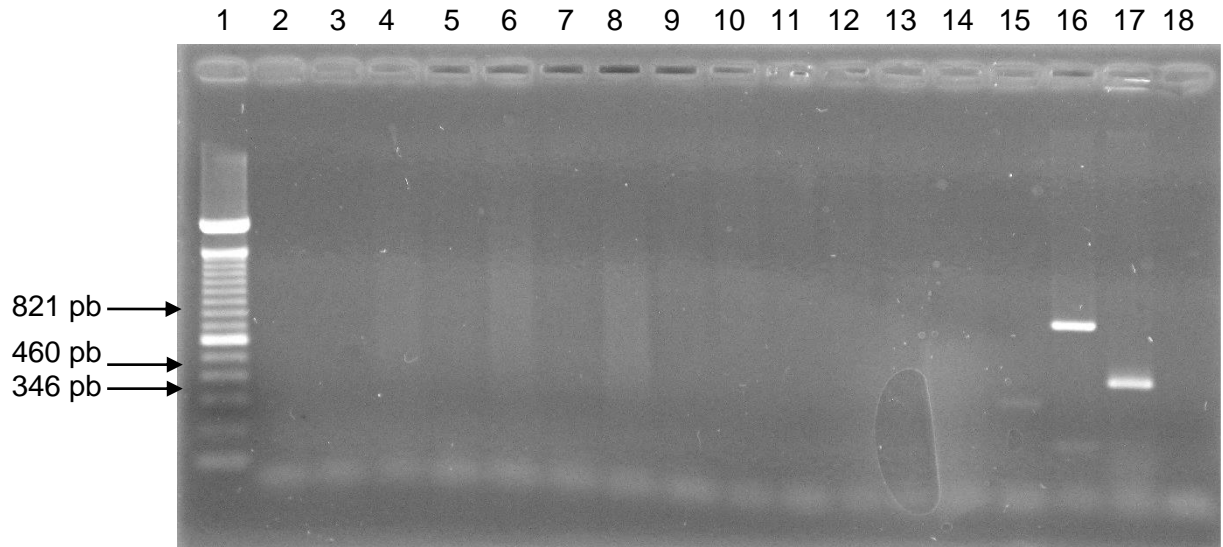


Figura 41 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de multiplex PCR. 1- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 até 14- Amostras de campo (Lote 2/Granja 4); 15- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (346 pb); 16- Controle positivo *Haemophilus parasuis* (821 pb); 17- Controle positivo *Pasteurella multocida* (460 pb); 18- Controle negativo – São Paulo, 2015.

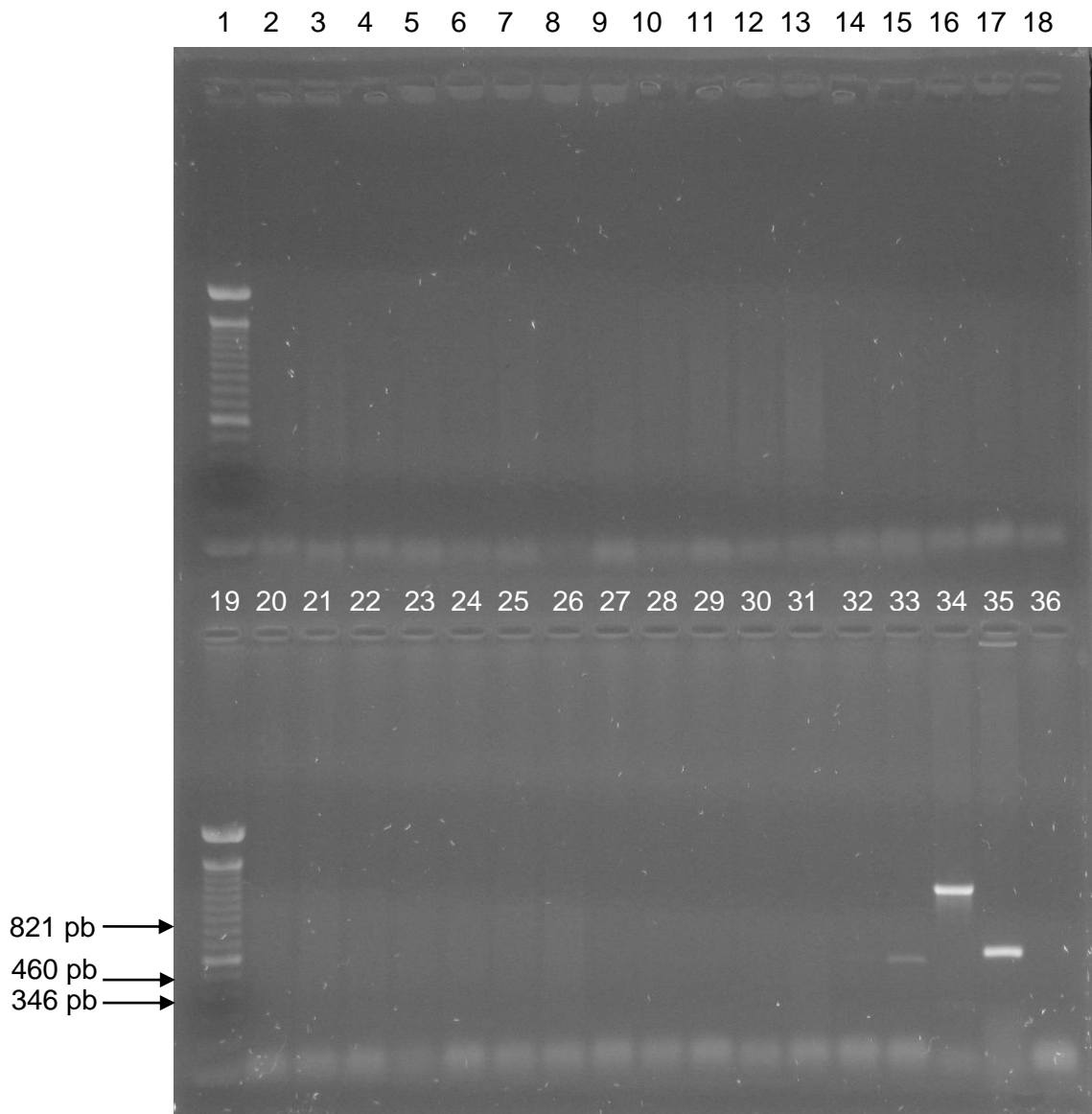


Figura 42 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de multiplex PCR. 1 e 19- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 a 18; 20 a 32- Amostras de campo (Lote 4/Granja 4); 33- Controle positivo *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 34- Controle positivo *Haemophilus parasuis*; 35- Controle positivo *Pasteurella multocida*; 36- Controle negativo – São Paulo, 2015.

6.5.3. Nested PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae*

Foram testadas as 115 amostras da Granja 4 pela técnica de nested PCR, sendo que 113 delas foram positivas para o agente (98,26%). Na Figura 43 pode ser observada parte das análises realizadas. É importante acrescentar que o tamanho do fragmento é 352 pb.

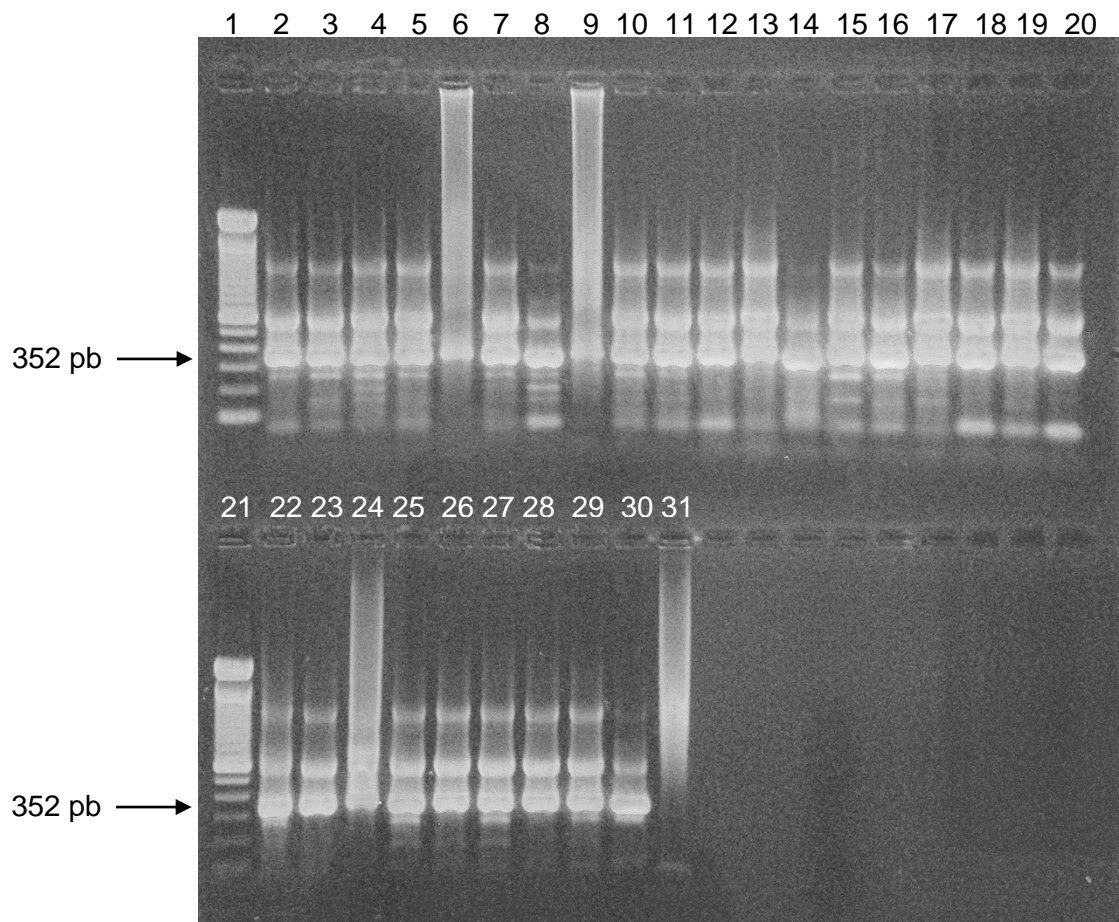


Figura 43 - Resultado do teste das amostras de campo utilizando a técnica de nested PCR. 1 e 21- 100pb Ladder (Invitrogen®); 2 a 20; 22 a 31- Amostras de campo (Lote 4/Granja 4); 30- Controle positivo *Mycoplasma hyopneumoniae* (352 pb); 31- Controle negativo – São Paulo, 2015.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada na Granja 4 (115 suínos) a análise de variância considerando a infecção conjunta de *Streptococcus* sp e Mhyo, ou somente Mhyo. Tendo em vista que quase 100% dos animais foram positivos para Mhyo, o que diferencia o primeiro do segundo grupo é a presença do *Streptococcus* sp e, portanto, este será considerado o patógeno principal. Foram avaliadas as variáveis zootécnicas: peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno no final da terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR).

Considerando erro alfa 0,05 ($\alpha = 5\%$), para animais positivos apenas para Mhyo ou infectados por ambos os agentes (*Streptococcus* sp associado ao Mhyo), não houve interferência na variável PN ($p > 0,05$), porém, houve interferência nas variáveis GMD, PF e PCAR (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo do quadro de Análise de Variância para animais positivos apenas para Mhyo ou infectados por ambos os agentes (*Streptococcus* sp associado ao Mhyo), segundo as fontes de variação (peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015.

Fontes de variação	Positivo Mhyo Média \pm desvio padrão	Ambos Média \pm desvio padrão	Pr > F
PN	1,75 \pm 0,03	1,91 \pm 0,08	0,0633
GMD	0,56 \pm 0,01	0,61 \pm 0,02	0,0030
PF	78,42 \pm 1,34	87,65 \pm 3,19	0,0088
PCAR	62,57 \pm 1,23	70,12 \pm 2,92	0,0190

Considerando as lesões macroscópicas, o pulmão com textura alterada (enfisematoso) afetou significativamente o PF o PCAR. As demais lesões macroscópicas não afetaram nenhuma das outras características produtivas (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo do quadro de Análise de Variância para característica de lesões macroscópicas pulmonares de suínos, segundo as fontes de variação (peso do suíno no final de terminação (PF) e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015.

Fontes de variação	Tipo de lesão macroscópica	Sem lesão Média ± desvio padrão	Com lesão Média ± desvio padrão	Pr > F
PF	Textura pulmonar alterada (enfisematoso)	80,70 ± 1,26	65,84 ± 4,91	0,0041
PCAR	Textura pulmonar alterada (enfisematoso)	64,65 ± 1,13	49,46 ± 4,42	0,0012

Considerando as lesões microscópicas, os debris celulares no lúmen dos bronquíolos afetaram significativamente o PF e o PCAR. A presença de fibrina intersticial afetou o PF e o GMD e PCAR e o enfisema afetou significativamente o PCAR (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo do quadro de Análise de Variância para característica de lesões microscópicas pulmonares de suínos, segundo as fontes de variação (peso do suíno no final de terminação (PF), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD) e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015.

Fontes de variação	Tipo de lesão microscópica	Sem lesão Média ± desvio padrão	Com lesão Média ± desvio padrão	Pr > F
PF	Debris celulares no lúmen dos bronquíolos	75,40 ± 2,13	82,00 ± 1,51	0,0129
	Fibrina intersticial	68,50 ± 5,40	80,41 ± 1,28	0,0340
GMD	Fibrina intersticial	0,51 ± 0,02	0,56 ± 0,006	0,0476
PCAR	Debris celulares no lúmen dos bronquíolos	59,60 ± 1,93	65,77 ± 1,37	0,0106
	Fibrina intersticial	51,78 ± 4,87	64,36 ± 1,15	0,0134
	Enfisema	57,84 ± 2,74	64,88 ± 1,24	0,0213

De uma visão mais ampla, pode-se observar na Tabela 9 um resumo das médias encontradas em cada fonte de variação (índices zootécnicos) e na Tabela 10 a distribuição dos animais infectados apenas com Mhyo, ou *Streptococcus* sp associado ao Mhyo, segundo sexo macho ou fêmea, com o número total de animais analisados, ou seja, 115 suínos em período de terminação.

Tabela 9 - Resumo da média de Análise de Variância para fontes de variação (peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno no final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR) – São Paulo, 2015.

Fontes de variação	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
PN	115	1,76	0,34	1,00	2,83
GMD	115	0,56	0,07	0,40	0,76
PF	115	79,76	13,64	43,00	111,00
PCAR	115	63,67	12,44	33,54	86,59

Tabela 10 - Distribuição dos animais infectados apenas com Mhyo, ou Mhyo associado à *Streptococcus* sp segundo sexo macho ou fêmea – São Paulo, 2015.

Mhyo				Ambos			
Macho		Fêmea		Macho		Fêmea	
Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
50	0	46	0	8	0	9	2

5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou encontrar animais sororeagentes para App em quatro granjas e correlacionar com os achados histopatológicos (HE), isolamento bacteriano e detecção por PCR. No decorrer do trabalho, ao verificar lesões macroscópicas ao abate e sendo negativo para o agente pesquisado (App), percebeu-se a necessidade de verificar agentes diferenciais que poderiam causar lesões semelhantes. Dessa forma, buscou-se o diagnóstico diferencial por meio de combinações de técnicas. É importante salientar, que nenhum teste diagnóstico apresenta 100% de especificidade e sensibilidade e o uso combinado de testes pode ser preferível para melhor interpretação dos resultados (NIELSEN, 1988).

Cabe salientar a importância do *status* sanitário da granja, fato esse que determina o surgimento de muitas doenças infecciosas, dentre elas, as doenças respiratórias causadas por agentes bacterianos. Isso pode ser observado nos resultados que foram encontrados, onde as granjas que possuíam um maior descuido em relação à sanidade foram as que apresentaram animais sororeagentes para App.

Como reflexo da granja, as lesões ao abate de suínos no frigorífico devem ser observadas. Nas quatro granjas analisadas foram encontradas características macroscópicas, como a presença de nódulos pulmonares encapsulados no parênquima pulmonar, abscessos pulmonares, pleurite e pericardite fibrinosa, e caso com aderência na carcaça, além de nódulos necróticos, que são descritos como possíveis sequelas de broncopneumonias fibrinosas (LÓPEZ, 1998). Além disso, os linfonodos apresentaram-se reativos e hemorrágicos.

Quanto a detecção de anticorpos na identificação de reação para App, é importante lembrar que vários testes diagnósticos têm sido descritos, sendo o ELISA o teste mais utilizado, pois permite que grande número de amostras sejam analisadas simultaneamente, além de apresentar facilidade na execução e boa sensibilidade (GOTTSCHALK et al., 1994), entretanto, o sorodiagnóstico é ferramenta que pode complementar as técnicas de biologia molecular, porque o primeiro diagnostica anticorpos (resposta imune ao antígeno), e o segundo a presença do antígeno. Por isso a necessidade de adotar a realização de mais técnicas para buscar o diagnóstico.

Alguns rebanhos de suínos podem apresentar sorologia positiva para App, mas não demonstram os sinais clínicos da doença (GAGNÉ et al., 1998), ou lesão macroscópica. Nestes casos é possível que os rebanhos infectados sorologicamente positivos apresentem ótimo *status* imunológico e tolerância à doença, ou é indicativo que a infecção ocorreu por amostras de baixa virulência, podendo tornar-se portador. Por outro lado, muitos animais

apresentam sorologia negativa e carregam o App nas cavidades nasais e tonsilas, sem sinais clínicos, mostrando que o agente pode colonizar o trato respiratório superior sem indução da soroconversão (SIDIBÉ et al., 1993; CHIERS et al., 2002). Deste modo, o isolamento do agente ou a PCR são importantes para confirmar a infecção (GAGNÉ et al., 1998).

No exame de cultivo bacteriológico, existe uma dificuldade básica no diagnóstico de algumas infecções bacterianas do trato respiratório, que se relaciona com o fato de ser esse um ambiente contaminado por ampla variedade de microorganismos comensais. Por ser uma extensão do ambiente externo, as vias respiratórias são constantemente expostas ao contato e colonização por microorganismos em suspensão no ar atmosférico.

Além disso, pode ser considerado um dos principais motivos pelo qual não foi possível o isolamento do App, pelo uso intensivo de antibióticos para controlar doenças respiratórias nas granjas de suínos com falhas ambientais, sendo que isso pode aumentar a chance da ocorrência de problemas de resistência bacteriana e antimicrobianos, bem como dificultar o diagnóstico.

Na pesquisa bacteriana descrita por Mores et al. (2011), das 87 amostras analisadas, em 40 (46,0%) houve crescimento bacteriano (*Pasteurella multocida* tipo A e *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* tipo D, Bacilos Gram negativos NAD dependentes). As outras 47 amostras (54,0%) não apresentaram crescimento bacteriano significativo, podendo estar relacionadas a animais previamente tratados com antimicrobianos ou infecções exclusivamente virais ou por *Mycoplasma hyopneumoniae*, pois este não foi pesquisado no método bacteriológico. Tendo em vista a importância do Mhyo como agente respiratório que causa lesões macroscópicas semelhantes ao App, sua análise também foi realizada no presente trabalho.

Outro fator que pode explicar a baixa sensibilidade da cultura bacteriana é o isolamento do App ter um crescimento lento. O crescimento de organismos dependentes de NAD, e facilmente invadidos por outras bactérias, perdendo a viabilidade, como descrito por Christensen et al. (1999). Dessa forma, observando os resultados pouco significativos encontrados, foi importante utilizar uma ferramenta para incrementar o diagnóstico, como a Multiplex PCR ou nested-PCR, as quais podem ser técnicas interessantes e importantes para a detecção rápida de agentes sem a necessidade de obtenção de culturas puras, o que facilita o processo e permite fechar o diagnóstico com êxito.

No caso das amostras pareadas de soro com órgãos (pulmão/linfonodo) do mesmo animal, que foram submetidas ao teste sorológico de ELISA com o bacteriológico, os resultados não foram representativos. Exemplo de um animal da Granja 3 que foi reagente no teste de ELISA para App, porém negativo no isolamento bacteriano. Portanto, houve a necessidade de utilizar a PCR para aumentar a sensibilidade e especificidade.

Ao realizar o diagnóstico diferencial do CDRS nos animais negativos para o App, foi possível isolar o *Streptococcus* sp em 15,91% das amostras da Granja 3 e 10,83% das amostras da Granja 4, porque o *Streptococcus* sp ter um crescimento mais fácil e rápido quando comparado a outras bactérias.

Na análise por meio da multiplex PCR, pode-se perceber que todas as amostras da Granja 4 (115 animais) foram negativas para App, HPS e Pm. Provavelmente esse resultado foi encontrado devido ao *status* sanitário da granja ser o melhor entre as granjas analisadas e os animais não apresentarem lesões pulmonares macroscópicas muito características das doenças analisadas nesta reação. Entretanto, na nested PCR feita para Mhyo, 98,26% das amostras foram positivas para o agente, sendo o Mhyo um agente primário e que abre portas para a ação de agentes secundários.

O resultado da nested PCR mostrou que o Mhyo esteve presente em praticamente todas as amostras analisadas (98,26%), mesmo naqueles animais que não apresentaram lesões pulmonares tão significativas. A presença do DNA de Mhyo não indica uma infecção ativa podendo ser uma infecção assintomática (colonização). No caso em que as lesões pulmonares foram mínimas, poderíamos afirmar que o agente se manteve, mas não em suficiente quantia para causar doença (TAMIOZZO, 2011).

Utilizou-se o protocolo de nested PCR por ser capaz de evidenciar sinal a partir de uma quantidade cinco vezes menor de material do que aquele presente na PCR, o que é muito interessante se tratando de amostras de campo, nas quais a concentração bacteriana pode estar reduzida e a viabilidade do DNA comprometida (FERRAZ et al., 2010).

Todos os animais da Granja 4 foram vacinados para Mhyo, e mesmo assim o resultado para o agente foi altamente positivo (98,26%), sendo que os suínos apresentaram lesões compatíveis, inclusive um animal apresentou aderência de pleura e pericárdio. As vacinas comerciais existentes no mercado são constituídas de células inteiras inativadas de Mhyo e são usadas no mundo todo. Estas vacinas demonstraram ser efetivas na redução dos sinais clínicos, mas somente uma proteção parcial contra o desenvolvimento de lesões e na transmissão do agente tem sido obtida, não previnem a colonização do Mhyo no trato respiratório dos suínos e não reduzem a transmissão do patógeno, sendo que há estudos que questionam sua eficácia (HAESEBROUCK et al., 2004), o que também foi constatado no presente estudo. Por isso a importância de haver mais estudos de patologia a campo com animais vacinados e não vacinados, além da importância de estudos de desenvolvimento de imunógenos eficazes e com cepas circulantes no Brasil.

Seria interessante ter animais negativos e positivos para Mhyo, para possibilitar a comparação entre o grupo de animais infectados e vacinados com animais não infectados e vacinados, porém, na granja 4, mesmo vacinados, quase 100% dos animais foram positivos ao Mhyo.

As amostras que foram isoladas *Streptococcus* sp (10,83%) e detectadas Mhyo (98,26%) da Granja 4, todas tiveram algum tipo de lesão macroscópica e microscópica pulmonar associada, discreta ou não.

As lesões macroscópicas encontradas mostraram como lesões mais frequentes nas 113 amostras positivas para Mhyo e/ou associadas a *Streptococcus* sp: marmoreio (45,00%), edema (20,62%), hemorragia (8,75%), pulmão friável (8,12%), pálido (7,50%), enfisematoso (4,38%), atrofia (2,50%), petéquias (1,89%), aderência de pleura (0,62%) e pericadite (0,62%), sendo estas lesões são compatíveis com estes patógenos, segundo Sobestiansky et al. (1999).

Com relação a análise estatística das lesões macroscópicas, o pulmão com a textura alterada (enfisematoso) afetou significativamente o PF ($p=0,0041$) e o PCAR ($p=0,0012$). As demais lesões macroscópicas não afetaram nenhuma das outras características produtivas. Na questão do peso corpóreo, observa-se uma média de peso menor nos animais que apresentaram enfisema pulmonar, tanto no PF (65,84 kg) como no PCAR (49,46), comparado aos animais sem lesão macroscópica (80,70 kg e 64,65 kg, respectivamente) (PALADINO, 2012).

As lesões microscópicas tabuladas em função da positividade do isolamento bacteriano para o *Streptococcus* sp e nested PCR para o Mhyo, demonstram que as lesões mais frequentes nas 113 amostras positivas para Mhyo foram: fibrina intersticial (10,33%), espessamento da pleura interlobular (10,42%), espessamento dos septos alveolares (10,23%), infiltrado mononuclear intersticial (10,23%), infiltrado mononuclear peribronquiolar (10,04%), enfisema (9,07%), espessamento da pleura visceral (7,63%), debris celulares no lúmen dos bronquíolos (7,24%), edema (6,66%), macicez pulmonar (5,60%), macrófagos espumosos (4,63%), neutrófilos no parênquima e no lúmen dos bronquíolos (4,44%), e hemorragia intersticial (3,47%), lesões conformes descritas por Sobestiansky et al. (1999).

A análise de variância das lesões microscópicas revelou que os debris celulares no lúmen dos bronquíolos afetaram significativamente o PF ($p=0,0129$) e o PCAR ($p=0,0106$). A presença de fibrina intersticial afetou o PF ($p=0,0476$), o GMD ($p=0,0340$) e PCAR ($p=0,0134$) e o enfisema afetou significativamente o PCAR ($p=0,0213$). A capacidade respiratória adequada é fundamental para o crescimento e engorda dos suínos (SOBESTIANSKY et al., 2001), sendo que as desordens respiratórias preocupam por constituírem um dos problemas mais importantes na suinocultura moderna, pelas perdas econômicas ocasionadas pela mortalidade, animais que se tornam refugos e condenação de carcaças (PALADINO, 2012).

A análise de variância das lesões microscópicas revelou que para as variáveis PF, GMD e PCAR, os animais com lesão apresentaram peso superior à média dos animais sem lesões, possivelmente devido ao desbalanceamento amostral.

Esses achados evidenciaram que a associação do Mhyo e *Streptococcus* sp causam sérias lesões pulmonares, pois atuam em conjunto agravando o quadro clínico. Entretanto, pode-se pensar que haja ainda outros agentes envolvidos concomitantemente e que não foram pesquisados nesse trabalho, como agentes virais imunossupressores, tendo como exemplo o Circovírus suíno 2 (*Porcine Circovirus 2* - PCV2).

A média do PN dos animais positivos para ambos *Streptococcus* sp e Mhyo foi 1,91 kg, enquanto que dos animais positivos somente para Mhyo foi 1,75 kg, não havendo interferência da doença no peso ao nascimento.

A média do GMD dos animais positivos para ambos *Streptococcus* sp e Mhyo foi 0,61 kg, enquanto que dos animais positivos somente para Mhyo foi 0,56 kg, havendo um menor ganho de peso neste último. Este resultado pode ser devido a um desbalanceamento das amostras, com relação a idade de abate, pois ela também influencia no GMD.

A média do PF dos animais positivos para ambos *Streptococcus* sp e Mhyo foi 87,65 kg, enquanto que dos animais positivos somente para Mhyo foi 78,42 kg, havendo um menor ganho de peso neste último. Este resultado pode ser devido a um desbalanceamento das amostras, com relação a idade de abate, pois ela também influencia no PF.

A média do PCAR dos animais positivos para ambos *Streptococcus* sp e Mhyo foi 70,12 kg, enquanto que dos animais positivos somente para Mhyo foi 62,57 kg, havendo um menor ganho de peso neste último. Este resultado pode ser devido a um desbalanceamento das amostras, com relação a idade de abate e sexo, pois ela também influencia no PCAR.

Com base nos índices zootécnicos publicados pela Embrapa (2006), o limite do peso médio dos leitões ao nascer (kg) foi 1,4 Kg, sendo ideal que o animal nasça maior que 1,5 kg. Quanto ao peso médio dos suínos na saída da terminação para o abate (kg), os índices Embrapa (2006) foram: animais aos 133 dias de idade devem apresentar limite de peso de 78 kg, sendo o ideal estarem acima dos 83 kg; aos 140 dias devem estar acima de 85 kg, sendo o ideal acima de 90 kg; aos 147 dias devem apresentar limite de peso de 92 kg, sendo o ideal estarem acima dos 97 kg; aos 154 dias o peso limite foi 98 kg, sendo o ideal apresentarem peso superior a 103 kg.

O grupo experimental total (granja 4) apresentou o PN médio de 1,76 kg, o PF 79,76 kg, ou seja, estão dentro dos padrões da suinocultura, publicados pela Embrapa (2006).

O efeito de desbalanceamento amostral não permitiu concluir se os patógenos *Streptococcus* sp e Mhyo estão interferindo nas variáveis zootécnicas, causando diminuição do peso no final da terminação, ganho de peso médio diário e peso da carcaça, sendo necessários estudos em grupos balanceados quanto a idade e que hajam animais negativos para Mhyo.

6. CONCLUSÃO

- ✓ Granjas de suínos do Estado de São Paulo com manejo sanitário precário, apresentaram animais sororeagentes ao ELISA para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), ao contrário de animais mantidos sob regime de biossegurança satisfatória, o que pode favorecer um aumento de animais sororeagentes ao App.
- ✓ O diagnóstico diferencial direto de agentes bacterianos envolvidos no complexo de doenças respiratórias de suínos (CDRS) ao abate não detectou *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* pela PCR. Por outro lado, o *Mycoplasma hyopneumoniae* apresentou 98,26% de positividade, indicando elevada frequência de ocorrência em plantel vacinado contra esta doença. O segundo patógeno mais frequente foi *Streptococcus* sp.
- ✓ São necessários estudos experimentais controlados em animais positivos e negativos para a infecção, em animais não vacinados para Mhyo, e em grupos balanceados quanto ao sexo e idade, a fim de verificar a interferência dos diferentes patógenos respiratórios dos suínos em variáveis zootécnicas.
- ✓ Apesar dos animais serem vacinados contra o *Mycoplasma hyopneumoniae*, foram observados suínos com lesões macroscópicas e microscópicas características deste patógeno, demonstrando que a vacina não protege contra a infecção, sendo necessário o desenvolvimento de imunógenos que previnam a doença. A prevenção desta doença faz-se necessária porque carcaças com adenopatia e aderência de pulmões estão sujeitas a tratamento com desvalorização da carne, ou descarte sanitário em frigorífico sob inspeção.
- ✓ O *Streptococcus* sp causou lesões macroscópicas e microscópicas nos animais, indicando necessidade de prevenção, tendo em vista que é uma zoonose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASCAL, E. N.; TENORIO, V. R.; SERRANO, J. J.; GARCIA, C.; GARZA, M. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degraded porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.58, n.2, p.83-86, 1994.
- ALBERTON, G. C.; MORES, M. A. Z. Interpretação de lesões no abate como ferramenta de diagnóstico das doenças respiratórias dos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, supl.1, p.s95-s99, 2008.
- ALMEIDA, F.; SPIGOLON, Z.; SILVA, T. P.; PEREIRA, R. E. P. Presumido, M. *Haemophilus parasuis* em suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Periódicos Semestral, FAMED/FAEF, Ano VI, n.11, 2008.
- ANDREASEN, M.; MOUSING, J.; THOMSEM, L. K. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, n.2, p.147-161, 2001.
- AMANO, H.; SHIBATA, M.; KAJIO, N.; MOROZUMI, T. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.56, n.4, p.639-644, 1994.
- ARENDS, J. P.; ZANEN, H. C. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. **Reviews of infectious diseases**, v.10, n.1, p.131-137, 1988.
- BATISTA, L.; PIJOAN, C.; RUIZ, A.; UTRERA, V.; DEE, S. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, n.2, p.75-77, 2004.
- BECK, M.; BOSCH, J. F. V. D.; JONGENELEN, I. M.; LOEFFEN, P. L.; NIELSEN, R.; NICOLET, J.; FREY, J. RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.11, p.2749-2754, 1994.
- BERSANO, J. G.; VILLALOBOS, E. M. C.; MONTEIRO, R. M. Prevalência do *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* em suínos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.2, p.251-253, 2003.
- BLACKALL, P. J., KLAASEN, H. L., VAN DEN BOSCH, H., KUHNERT, P.; FREY, J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v.84, supl.1, p.47-52, 2002.
- BLAHA, T.; VON HAMELL, M. L.; BEILAGE, E. Slaughter checks-integrated quality assurance systems, meat quality, antibiotics. In: **Proceedings of the 13th Congress of the International Pig Veterinary Society**, Bangkok, Thailand, p.424, 1994.
- BOSSÉ, J. T.; JOHNSON, R. P.; ROSENDAL, S. Capsular polysaccharide antigens for detection of serotype-specific antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.3, p.320-325, 1990.

BOROWSKI, S. M.; IKUTA, N.; LUNGE, V.; FONSECA, A.; MARQUES, E.; CARDOSO, M. Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.3, p.97-103, 2002.

BOROWSKI, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds). **Doença dos suínos**, Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.177-181.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. 1992. Lei nº 7.705, de 19 de fevereiro de 1992, art.9º.I, II, III. Disponível em: <<http://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/180776/lei-7705-92>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

BROCKMEIER, S. L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.1, p.75–78, 2004.

BUSQUE, P.; HIGGINS, R.; CAYA, F.; QUESSY, S. Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.61, n.4, p.275-279, 1997.

CASALMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; BOSCH, G. J. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. **Swine Health and Production**, v.7, n.6, p.263-268, 1999a.

CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.3, p.246-251, 1999b.

CASTILLA, K. S.; GOBBI, D. D. S.; MORENO, L. Z.; PAIXÃO, R.; COUTINHO, T. A.; SANTOS, J. L.; MORENO, A. M. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping. **Research in Veterinary Science**, v.92, n.3, p.366-371, 2012.

CHIERS, K.; DONNÉ, E.; VAN OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. **Veterinary Microbiology**, v.85, n.4, p.343-352, 2002.

CHO, W. S.; CHAE, C. Genotypic prevalence of apxIV in *A. pleuropneumoniae* field isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.2, p.175-177, 2001.

CHRISTENSEN, G.; SORENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.I; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of swine**. 8ed. Ames: Iowa State University Press. cap.61. 1999. p.913-940.

CLIFTON-HADLEY, F.A. *Streptococcus suis* type II infections. **British Veterinary Journal**, v.139, n.1, p.1-5, 1983.

CLIFTON-HADLEY, F.A.; ENRIGHT, M.R.; ALEXANDER, T.J.L. Survival of *Streptococcus suis* type 2 in pigs carcasses. **Veterinary Record**, v.118, n.10, p.275, 1986.

CLOUTIER, G.; D'ALLAIRE, S.; MARTINEZ, G.; SURPRENANT, C.; LACOUTURE, S.; GOTTS-CHALK, M. Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. **Veterinary microbiology**, v.97, n.1-2, p.135-151, 2003.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2ed., 1992. 843p.

COSTA, M. M.; BALESTRIN, R.; SCHRANK, A.; PIFFER, I. A.; SILVA, S. C.; SCHRANK, I. S. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. **Current Microbiology**, v.48, n.3, p.189-195, 2004.

COSTA, A. T. R.; LOBATO, F. C. F.; ABREU, V. L. V.; ASSIS, R. A.; REIS, R.; UZAL, F. A. Sorotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.2, p.113-115, 2005.

DAL BEM, E. L. Epidemiologia e anatomopatologia de lesões pulmonares de suínos em um matadouro em Cascavel - PR. 2008. 62f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias – Área de Patologia Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n.5, p. 233-237, 2001.

DOM, P.; HAESEBROUCK, F. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *A. pleuropneumoniae* strains. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, n.4, p.303-306, 1992.

DOM, P.; HAESEBROUCK, F.; KAMP, E. M.; SMITS, M. A. NAD independent *A. pleuropneumoniae* strains: Production of RTX toxins interactions with porcine phagocytes. **Veterinary Microbiology**, v.39, n.3-4, p.205-218, 1994.

DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: JUBB K.V.F.; KENNEDY P.C.; PALMER N. (Eds). **Pathology of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, v.2, 1993. p.539-698.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Boas práticas de produção de suínos. 2006. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br>. Acesso em: 22 nov.2014.

ERLANDSON, K. R.; EVANS, R. B.; THACKER, B. J.; WEGNER, M. W.; THACKER, E. L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.13, n.4, p.198-203. 2005.

FERRAZ, M. I. C. P.; FERREIRA, D. R.; GÓES, A. C.; GREGORI, F.; MIYASHIRO, S.; RUIZ, V. L. A. Detecção direta de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em órgãos de suínos do estado de São Paulo pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (nested-PCR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.143-148, 2010.

FODOR, L.; VARGA, J.; MOLNÁR, É.; HAJTÓS, I. Biochemical and serological properties of *A. pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine. **Veterinary Microbiology**, v.20, n.2, p.173-180, 1989.

GAGNÉ, A.; LACOUTURE, S.; BROES, A.; D'ALLAIRE, S.; GOTTSCHALK, M. Development of an immunomagnetic method for selective isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

serotype 1 from tonsils. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.251-254, 1998.

GOMES, M.J.P. Gênero *Streptococcus* spp. FAVET-UFRGS. 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Streptococcus%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2014.

GOTTSCHALK, M.; HIGGINS, R.; JACQUES, M.; BEAUDOIN, M.; HENRICHSEN, J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.11, p.2590-2594, 1991.

GOTTSCHALK, M.; LASALLE, F.; RADACOVICI, S.; DUBREUIL, J. D. Evaluation of long-chain lipopolysaccharides (LPS-CL) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. **Veterinary Microbiology**, v.38, p.315-327, 1994.

GOTTSCHALK, M.; SEGURA, M.; XU, J. *Streptococcus suis* infection in humans: the Chinese experience and the situation in North America. **Animal Health Research Reviews**, v.8, n.1, p.29-45, 2007.

GRAM, T.; AHRENS, P.; NIELSEN, J.P. Evaluation of a PCR for detection of *A. pleuropneumoniae* in mixed bacterial culture from tonsils. **Veterinary Microbiology**, v.51, n.1-2, p.95-104, 1996.

HANSEN, M. S.; PORS, S. E.; JENSEN, H. E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E. M.; NIELSEN, O. L. An investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, n.2-3, p.120-131, 2010.

HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.; VAN OVERBEKE, I.; DUCATELLE, R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. **Veterinary Microbiology**, v.58, n.2-4, p.239-249, 1997.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255-268, 2004.

HARRIS, D. L. **Multi-site pig production**. Ames: Iowa State University, 2000. 217p.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M., Streptococcal Diseases. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.I; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of swine**. 9. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, cap.47, 2006. p.769-783.

HOIE, S.; FALK, K.; LIUM, B. M. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds: IV Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.32, n.3, p.395-402, 1991.

HRIČÍNOVÁ, M.; HOLODA, E.; MUDROŇOVÁ, D.; ONDRAŠOVIČOVÁ, S. Multiplex PCR Assay for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* in Lungs of Pigs from a Slaughterhouse. **Folia Microbiologica**, v.55, n.6, p.635-640, 2010.

HUI, R. K. H., ZENG, F., CHAN, C.M. N., YUEN, K.Y., PEIRIS, J.S.M., LEUNG, F.C.C. Reverse Transcriptase PCR Diagnostic Assay for the Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, p.1994-1999, 2004.

INZANA, T. J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v.11, p.305-316, 1991.

JANKE, B. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia, samples for diagnosis. Mycoplasmal Pneumonia in Modern Swine Production Units. In: **ISU Veterinary Medicine Seminar**, Iowa State University, p.1-2, 1997.

JOBERT, J. L.; SAVOYE, C.; CARIOLET, R.; KOBISCH, M.; MADEC, F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.64, n.1, p.21-26, 2000.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. (Eds.) **Patologia Veterinária**. 1ª. Ed. Brasileira. Barueri: Editora Manole, 1415p., 2000.

JORDAN, D.; HOFFMAN, L.; THACKER, E. *Pasteurella multocida* as a component of porcine respiratory disease complex (PRDC). In: **Proceedings of the 37th American Association Of Swine Veterinarians**, p.149-152, 2006.

KATAOKA, Y.; SUGIMOTO, C.; NAKAZAWA, M.; MOROZUMI, T.; KASHIWAZAKI, M. The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infection in Japan from 1987 to 1991. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, n.4, p.623-626, 1993.

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

KICH, J. D.; MORÉS, N.; TRIQUES, N. J.; NOGUEIRA, M. G.; LOCATELLI, C.; KLEIN, C. S.; FELÍCIO, R. P. A *Pasteurella multocida* tipo A atua como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? **Comunicado Técnico**, n.469, 7p., 2007. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_x8g42b6i.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2014.

KICH, J.D.; KUCHISHI, S.S.; MORÉS, M.A.Z.; LARA, A.C. de. Agentes bacterianos de pneumonia associados a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, supl.1, p.s17-s27, 2010.

KOBISH, M. Mycoplasma disease in pigs - old diseases still causing trouble. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XVII. 2000, Melbourne. Proceedings...Melbourne: **International Pig Veterinary Society**, p. 434-438, 2000.

KONEMAN, E. W.; WILLIAM, M.J.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565p., 2008.

KRABBE, E. L.; SANTOS FILHO, J. I.; MIELE, M.; MARTINS, F. M.; Embrapa Suínos e Aves. Tópicos atuais na produção de suínos e aves: Cadeias produtivas de suínos e aves. Pelotas: Instituto Federal Sul-rio-grandense, p.9, 2013. 271 p.

KUCHIISHI, S. S., KICH, J. D., RAMENZONI, M. L. F., SPRICIGO, D., KLEIN, C. S., FÁVERO, M. B. B.; PIFFER, I. A. Sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados no Brasil de 1993 a 2006. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.79-82, 2007.

KWON, D.; CHOI, C.; CHAE, C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. **Veterinary Pathology**, v.39, n.5, p.584-587, 2002.

LOCATELLI, J. C.; MACHADO, A.; SILVA, A. S.; BARCELLOS, D. E. S. N. Ocorrência da pleuropneumonia suína causada pelo *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1981, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Veterinária do Rio Grande do Sul e Associação de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, p.36-37, 1981.

LÓPEZ, A. Sistema Respiratório. In: CARLTON, W.W.; McGAVIM, M.D. (Eds.). **Patologia Veterinária Especial** (De Thomson). 2. ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 03, 1998. p.132-170.

MACÊDO, N. R.; OLIVEIRA, S. R.; LAGE, A. P.; GUEDES, R. M. C. Epidemiologia molecular de *Haemophilus parasuis*. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2576-2582, 2009.

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

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

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; KRUIF, A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v.17, n.9-10, p.1024-1034, 1999.

MAES, D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: update on epidemiology and control. In: IPVS CONGRESS, 21, 2010, Vancouver, Canada. **Proceedings...**, p.30-35, 2010.

MAROIS, C.; LE DEVENDEC, L.; GOTTSCHALK, M.; KOBISCH, M. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.1, p.14-22, 2007.

MATTSSON, J.G.; BERGSTROM, K.; WALLGREEN, P.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 893-897, 1995.

MENIN, A.; GAVA, D.; VAZ, E. K. Aspectos gerais sobre a infecção por *Haemophilus parasuis* em suínos – revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.4, n.2, p.148-156, 2005.

McGAVIN, M.; ZACHARY, J.F. (Eds.). **Pathologic basis of veterinary diseases**. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007.

MITTAL, K. R. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1, 9 and 11. **Research in Veterinary Science**, v.55, n.2, p.179-184, 1993.

MOOR, C. E. Septicemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R, S and T. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.29, n.1, p.272-280, 1963.

MOREAU, I. A.; MILLER, G. Y.; BAHNSON, P. B. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M. hyopneumoniae* and porcine

reproductive and respiratory syndrome virus. **Vaccine**, v.22, n.17-18, p.2328-2333, 2004.

MORES, N.; SOUZA, J.C.A.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da Pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). Patogenicidade e evolução das lesões anátomo-patológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n.6, p. 679-693, 1984.

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

MORES, M. A. Z.; KUCHIISHI, S.S.; ASCOLI, K.R.; MORÉS, N. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. In: XV Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2011. Fortaleza, CD Room. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54009/1/Marcus-Mores-Abraves-2011.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2014.

MORENO, A.M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M.R. Levantamento sorológico para *Actinobacillus pleuropneumoniae* em criações de suínos no período de dezembro de 1996 a julho de 1999. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1999, Porto Alegre, RS. **Anais**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, p.159-160, 384p, 1999.

MORENO, L. Z.; CASTILLA, K. S.; GOBBI, D. D. S.; COUTINHO, T. A.; FERREIRA, T. S. P.; MORENO, A. M. ERIC-PCR Genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian Swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p.1420-1426, 2011.

NEDBALCOVA, K.; SATRAN, P.; JAGLIC, Z.; ONDRIASOVA, R.; KUCEROVA, Z. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. **Review Article Veterinarni Medicina**, v.51, n.5, p.168-179, 2006.

NICOLET, J. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus paraahaemolyticus*. **Zentralbl Bacteriol**, v.216, n.4, p.487-495, 1971.

NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: **Diseases of Swine**, 7^a edição. Editor: B. E. Straw. Iowa University Press Iowa, 1992. p.401-408.

NIELSEN, R. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Canadian Veterinary Journal**, v.29, n.7, p.580-582, 1988.

NOYES, E. P.; FEENEY, D. A.; PIJOAN, C. Comparison of the effect of the pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. **Journal of American Medicine Veterinary Association**, v.197, n.8, p.1025-1029, 1990.

OLIVEIRA, S.; GALINA, L.; PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.6, p.495-501, 2001.

OLIVEIRA, S.; PIJOAN, C. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. **Journal of Swine Health and Production**, v.10, n.5, p.221–225, 2002.

- OLIVEIRA, S. Atualização em diagnóstico: *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Suínos & Cia**, Ano VI, n.31, p.14-18, 2009.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; HALBUR, P. Porcine circovirus type-2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.6, p.591-615, 2007.
- OPRIESSNIG, T.; GIMENEZ-LIROLA, L. G.; HALBUR, P. G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v.12, n.2, p.133-148, 2011.
- PALADINO, E. S. Aspectos anatomopatológicos de pneumonias em suínos de terminação causadas pela *Pasteurella multocida* de alta patogenicidade. 51f. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- PIFFER, I. A.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; BARCELLOS, D. E. S. N. Sorotipos de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolados de suínos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.3, n.7, p.79-83, 1987.
- PIFFER, I. A.; KLEIN, C; FÁVERO, M; FIGUEIREDO J. Caracterização bioquímica e sorológica de amostras de *A. pleuropneumoniae* isoladas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.1, p.123-129, 1997.
- PIJOAN, C.; LASTRA, A.; RAMIREZ, C.; LEMAN, A. D. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.5, p.522-523, 1984.
- PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: LEMAN, A. (Eds) **Diseases of swine**. 8.ed. Iowa; Iowa State University Press, p. 511-520, 1999.
- PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE; et al. (Eds.) **Diseases of swine**. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, p. 719-726, 2006.
- PRIETO, C.; PENA, J.; JUAREZ, P.; IMAZ, M.; CASTRO, J. M. Isolation and distribution of *Streptococcus suis* capsular types from diseased pigs in Spain. **Journal of Veterinary Medicine Series-B**, v.40, n.8, p.544-548, 1993.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H.(Orgs.) **Métodos Histotécnicos**. Washington: Registro de Patologia de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, 1995. 280p.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Capítulo 21- Gênero *Actinobacillus* In: _____ **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1.ed. Artemed Editora S.A: Porto Alegre, p. 67-70, 2005.
- RAPP-GABRIELSON, V.J. *Haemophilus parasuis*. In: STRAW B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.I.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, IA: Iowa State, 1999. p.475-481.
- REAMS, R.Y.; GLICKMAN, L.T.; HARRINGTON, D.D.; THACKER, H.L.; BOWERSOCK, T.L. *Streptococcus suis* infection in swine: A retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, n.3, p.326-334, 1994.

ROHRBACH, B. W.; HALL, R. F.; HITCHCOCK, J. P. Effect of subclinical infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in commingled feeder swine. **JAVMA**, v.202, n.7, p.1095-1098, 1993.

ROSENDAL, S.; BOYD, D. A. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p.840-843, 1982.

ROSENDAL, S.; MITCHELL, W. R. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs: a survey of Ontario pork producers, 1981. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, n.1, p.1-5, 1983.

RUIZ, V. L. A.; GREGORI, F.; BERSANO, J. G.; FERRAZ, M. I. C. P. Divulgação técnica: Pleuropneumonia suína. **Biológico**, v.67, n.1, p.39, 2005.

SANFORD, S. E.; HIGGINS, R. Streptococcal diseases. In: L, A. D.; STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1992. p. 588-590.

SANTOS, J. L.; BRITO, M. A. A. P.; LEITE, R. C. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus parasuis* em rebanhos tradicionais no Brasil. In: IPVS CONGRESS, 15, 1998, Birmingham. **Anais...** p.277, 1998.

SCHALLER, A.; DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; FORBES, W. A.; KUHN, R.; KUHNERT, P.; GOTTSCHALK, M.; NICOLET, J.; FREY, J. Identification and detection of *A. pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. **Veterinary Microbiology**, v.79, n.1, p.47-62, 2001.

SHOKOUHI, V. Nuevos horizontes en el diagnóstico y control de las infecciones respiratorias. Evaluación económica de las medidas de control. **Anaporc**, v.78, p.46-60, 1998.

SIDIBÉ, M.; MESSIER, S.; LARIVIERE, S.; GOTTSCHALK, M.; MITTAL, K. R. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, n.3, p.204-208, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M., ROEHE, P. M. Pleuropneumonia In: _____ **Clínica e patologia suína**. 2ed. Goiânia: Gráfica Art3, p.353-358, 1998.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S.J.; CARVALHO, L.F.O.S.; MORENO, A.M., ROEHE, P.M. **Clínica e patologia suína**. 2ed., Goiânia, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA, O.; MORES, N.; BARIORINI JUNIOR, W., PIFFER, I.A.; GUZZO, R. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. Comunicado técnico: Embrapa, 2001.

SOBESTIANSKY, J.; RISTOW, L.E.; MATOS, M.P.C.; et al. Micoplasmoses – Pneumonia enzoótica. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds). **Doença dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.159-169.

SORENSEN, V., JORSAL, S.E., MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B. E. et al. (Eds.). **Diseases of swine**. 9. ed. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK, cap.7, 2006. p.149 -178.

STRAW, B. E.; TUOVINEM, V. K.; BIGRAS-POULIN, M. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.12, p.1702-1706, 1989.

SOLANO-AGUILAR, G. I.; PIJOAN, C.; RAPP-GABRIELSON, V. J.; COLLINS, J.; CARVALHO, L. F.; WINKELMAN, N. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.1, p.81-87, 1999.

STARK, K. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine- a literature review. **The Veterinary Journal**, v.159, n.1, p.37-56, 2000.

TALAMINE, T. J. D.; MARTINS, F. M.; ARBOIT, C.; WOLOZSYN, N. Custos agregados da produção integrada de suínos nas fases de leitões e de terminação. Custos e Agronegócio on line, v.2, Edição Especial, 2006. Disponível em: <www.custoseagronegocioonline.com.br>. Acesso em: 13 jul. 2014.

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

TAYLOR, J. D. The Lungs. In: SIMS, L.D.; GLASTONBURY, J.R.W. (Eds.). **Pathology of the pig. A Diagnostic Guide**. Barton: The Pig Research and Development Corporation, cap.14, 1996. p.219-238.

TAYLOR, D. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds). **Diseases of Swine**. Oxford: Blackwell Science, p.343-354, 1999.

THACKER, E.; HALBUR, P.; ROSS, R.; THANAWONGNUWECK, R.; TRACKER, B. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus- induced pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.3, p.620-627, 1999.

THACKER, E. L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.17, n.3, p.551-565, 2001.

THACKER E.L. Evaluation of diagnostic assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*: Their potential role in eradication success. **Pork Checkoff. National pork board**, 2007. Disponível em: < <http://www.pork.org/FileLibrary/ResearchDocuments/05-006-THACKER-ABS.pdf>>. Acesso em: 04 set. 2014.

TOWNSEND, K. M.; FROST, A. J.; LEE, C. H. W.; PAPADIMITRIOU, J. M.; DAWKINS, H. J. Development of PCR assays for species- and type- specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1096-1100, 1998.

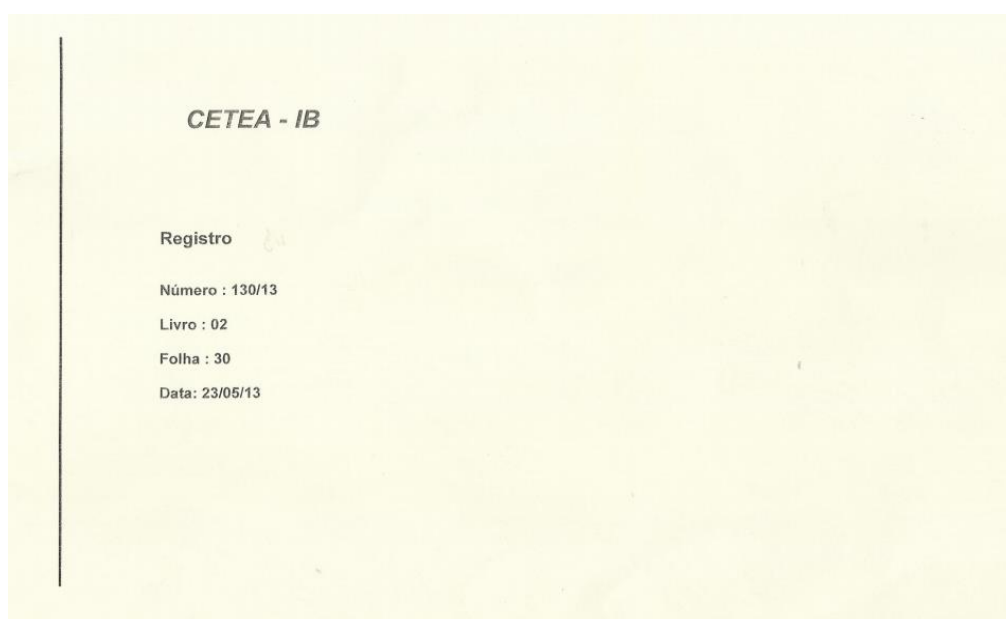
VAHLE, J. L.; HAYNES, J. S.; ANDREWS, J. J. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal ucosa following intranasal inoculation of cesarean-derived colostrum deprived (CDCD) swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.61, n.3, p.200-206, 1997.

VASCONCELOS, D.; MIDDLETON, D. M.; CHIRINO-TREJO, J. M. Lesions caused by natural infection with *Streptococcus suis* type 9 in weaned pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, n.3, p.335-341, 1994.

- VILLARREAL, I. Epidemiology of *M. hyopneumoniae* infections and effect of control measures. Belgium, 2010. 221f. **Tese** (Doutorado), Ghent University, Belgium, 2010.
- WELLENBERG, G. J.; BOUWKAMP, F. T.; WOLF, P. J. V. D.; SWART, W. A.; MOMBARG, M. J., DE GEE, A. L. A study on the severity and relevance of porcine Circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases. **Veterinary Microbiology**, v.142, n.3-4, p.217-224, 2010.
- WINDSOR, R. S.; ELLIOT, S. D. Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. **Journal of Hygiene**, v.75, n.1, p.69-78, 1975.
- WISSELINK, H. J.; SMITH, H. E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; PEPPERKAMP, K.; VECHT, U. Distribution of capsular types and production of muramidase released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. **Veterinary Microbiology**, v.74, n.3, p.237-248, 2000.
- XIAO, G. S.; CAO, S. J.; DUAN, L. L.; WEN, X. T.; MA, X. P., CHEN, H. M. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes ApxIVA and OmlA. **Agricultural Sciences in China**, v.5, n.2, p.146-154, 2006.
- YAGIHASHI, T.; NUNOYA, T.; TAJIMA, M. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.46, n.5, p.705-713, 1984.
- YAGUE, A. P. Complejo respiratório porcino: Aspectos Básicos. **Avances en Tecnología Porcina**, v.9, n.87, p.42-56, 2012.
- ZANELLA, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES N. Circovirose. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. (Eds). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editora, 2007. cap. p.213-225.
- ZANEN, H. C.; ENGEL, H. W. B. Porcine streptococci causing meningitis and septicaemia in man. **Lancet**, v.1, n.7919, p.1286-1288, 1975.
- ZHAO, G.; PIJOAN, C.; MURTAUGH, M. P. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. In: International Pig Veterinary Society Congress, 12., 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: International Pig Veterinary Society, p.157, 1992.
- ZUCKER, B.; KRÜGER, M.; HORSCH, F. Differentiation of *Pasteurella multocida* subspecies multocida isolates from the respiratory system of pigs by using polymerase chain reaction fingerprinting technique. **Journal of Veterinary Medicine Series-B**, v.43, n.10, p.585-591, 1996.

8. ANEXOS

Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CETEA), aprovado em 23 de maio de 2013.



Anexo 2: Boletim epidemiológico

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

QUESTIONÁRIO SANITÁRIO

FICHA Nº:	
--------------	--

1. IDENTIFICAÇÃO

PROPRIETÁRIO:				
PROPRIEDADE:				
ENDEREÇO:				
MUNICÍPIO:			ESTADO:	
CEP:		CAIXA POSTAL:		TEL.: ()
E-MAIL:				

2. DADOS DO REBANHO SUÍNO

A. POPULAÇÃO ANIMAL

Nº ANIMAIS NA PROPRIEDADE:		Nº FÊMEAS REPRODUTORAS:	
Nº MACHOS REPRODUTORES:		TOTAL DE ANIMAIS TERMINADOS/ANO:	

B. FINALIDADE DA EXPLORAÇÃO

PRODUÇÃO DE LEITÕES:	()	TERMINAÇÃO:	()
CICLO COMPLETO:	()	OUTRO:	

C. TIPO DE CRIAÇÃO

INTENSIVO:	()	SEMI- INTENSIVO:	()	EXTENSIVO:	()
------------	-----	---------------------	-----	------------	-----

D. REPOSIÇÃO DO PLANTEL

PRÓPRIO REBANHO:	()	OUTROS REBANHOS:	()	AMBOS:	()
---------------------	-----	---------------------	-----	--------	-----

E. INSTALAÇÕES PREDOMINANTES

ALVENARIA:	()	MADEIRA:	()	MISTA:	()	OUTRO:	
------------	-----	----------	-----	--------	-----	--------	--

F. TIPO DE ALIMENTAÇÃO UTILIZADA							
RAÇÃO COMPLETA:	()	FORMULAÇÃO PRÓPRIA:	()	OUTRO:			
RESÍDUO DE COMIDA/ DE INDÚSTRIA:	()	É FERVIDO?	SIM ()	NÃO ()			

3. MEDIDAS PROFILÁTICAS

A. VACINAÇÃO				
UTILIZA VACINA?	SIM ()	NÃO ()		
QUAIS VACINAS E EM QUE IDADE?				

B. TESTES DIAGNÓSTICOS				
REALIZA TESTES PERIÓDICOS?	SIM ()	NÃO ()	QUAIS:	

C. DESTINO DOS CADÁVERES							
ABANDONA A CÉU ABERTO?	()	CREMAÇÃO?	()	ENTERRA?	()	FOSSA?	()
RIO/CÓRREGO?	()	OUTRO:					

D. DEJETOS				
QUANDO É FEITA A RETIRADA DOS DEJETOS?				
DESTINO DOS DEJETOS?				
SOFRE ALGUM TIPO DE TRATAMENTO?	SIM ()	NÃO ()	QUAIS:	

E. LIMPEZA E DESINFECÇÃO					
COM QUE FREQUÊNCIA É REALIZADA A LIMPEZA (LAVAGEM) DAS INSTALAÇÕES?					
TODOS OS DIAS?	()	SEMANALMENTE?	()	A CADA QUINZE DIAS?	()
OUTRO:					
É REALIZADA A DESINFECÇÃO PERIÓDICA DAS INSTALAÇÕES?					
SIM ()	NÃO ()	QUAL DESINFETANTE?			

F. CONTROLE DE ACESSO				
É FEITO O CONTROLE DE ACESSO À GRANJA?		NÃO ()	DE VEÍCULOS	()
DE PESSOAS	()	AMBOS	()	OUTRO:

4. INDICADORES DE SAÚDE/PRODUTIVIDADE

A. TAMANHO MÉDIO DO LOTE

<100	()	100-200	()	200-300	()	>300	() Qtd: _____
------	-----	---------	-----	---------	-----	------	----------------

B. IDADE DE ENTRADA DOS LEITÕES NA TERMINAÇÃO

< 60 dias	()	60-65 dias	()	65-70 dias	()	>70 dias	()
-----------	-----	------------	-----	------------	-----	----------	-----

C. PESO DE ENTRADA DOS LEITÕES NA TERMINAÇÃO

<20 Kg	()	20-23 Kg	()	23-25 Kg	()	>25	()
--------	-----	----------	-----	----------	-----	-----	-----

D. IDADE MÉDIA DE ABATE

120 A 130 DIAS	()	131 A 140 DIAS	()	141 A 150 DIAS	()	>150 DIAS	()
----------------	-----	----------------	-----	----------------	-----	-----------	-----

E. PESO MÉDIO DE ABATE

ATÉ 80 Kg	()	81 A 90 Kg	()	91 A 100 Kg	()	101 A 110 Kg	()	> 110 Kg	()
-----------	-----	------------	-----	-------------	-----	--------------	-----	----------	-----

F. MORBIDADE E MORTALIDADE POR SINTOMAS RESPIRATÓRIOS NO LOTE TERMINAÇÃO

% DOENTES	% MORTOS
-----------	----------

G. OS ANIMAIS SÃO ENVIADOS PARA QUAL MATADOURO COM INSPEÇÃO SANITÁRIA?

--

H. HÁ DESCARTE DE CARÇAÇA NO LOTE TERMINAÇÃO POR LESÕES RESPIRATÓRIAS? (QUANTO?)

--

5. ASSISTÊNCIA VETERINÁRIA

PERMANENTE	()	EMERGENCIAL	()	PERIÓDICA	()	NÃO TEM	()
------------	-----	-------------	-----	-----------	-----	---------	-----

DATA: ____/____/ 2015

NOME DA PESSOA ENTREVISTADA: _____

NOME DO ENTREVISTADOR: _____

Anexo 3 - Kit para detecção de anticorpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Protocolo do teste de ELISA (IDEXX® APP-ApxIV Teste Ab)

Todos os reagentes devem atingir 18-26°C antes do uso. Os reagentes devem ser homogeneizados por movimentos gentis ou por vórtex. Usar uma ponteira diferente para cada amostra.

1. Separe as placas e anote a posição das amostras em folha de trabalho.
2. Diluir previamente cada amostra e controles a 1:10 em um tubo usando diluente de amostra. Por exemplo 15µL de amostra ou controle + 135µL de diluente de amostra.
3. Distribuir 100µL das amostras e controles pré-diluídos nas cavidades apropriadas da placa de microtitulação
4. Cobrir a placa de microtitulação e incubar por 60 minutos (+- 5 min.) a +37°C (+-3°C) em uma câmara úmida.
5. Lavar a cavidade com aproximadamente 300µL de Solução de Lavagem por 5 vezes. Aspirar o conteúdo de todas as cavidades após cada lavagem. Evitar que a placa seque entre as lavagens e antes de adicionar o conjugado. Após a aspiração final, eliminar o fluído residual de lavagem de cada placa batendo-a firmemente em material absorvente.
6. Distribuir 100µL do Conjugado em cada cavidade.
7. Cobrir e incubar a placa de microtitulação por 60 minutos (+- 5 min.) a +37°C (+-3°C) em uma câmara úmida.
8. Repetir o passo 5.
9. Distribuir 100µL de Substrato TMB N°12 em cada cavidade.
10. Incubar o substrato a 18-26°C durante 15 minutos (+- 1min.).
11. Parar a reação cromática adicionando 100µL de solução de interrupção TMB N°3 por cavidade. A solução de interrupção deverá ser colocada na mesma ordem e na mesma velocidade utilizadas com o substrato.
12. Zerar a leitora com ar.
Medir e registrar os valores de densidade óptica das amostras e controles a 450nm.
Calcular os resultados.

Princípio da técnica

Placas de microtitulação são impregnadas com o antígeno bacteriano recombinante ApxIV. As amostras testadas foram diluídas a 1:10 utilizando o diluente da amostra e incubadas nas cavidades da placa por 60 minutos. Qualquer anticorpo específico contra ApxIV liga-se ao antígeno nas cavidades e forma complexo antígeno/anticorpo que fica aderido na placa. O material não ligado é removido da placa pela lavagem. Após, é adicionado o conjugado anti-IgG suína marcado com peroxidase que se liga a anticorpos suínos ligados ao antígeno ApxIV, sendo que o conjugado não ligado é removido pela lavagem e o substrato que contém TMB (Tetrametilbenzidina) é adicionado às cavidades. Há então, o procedimento de cor (densidade óptica medida a 450nm) que é gradual e é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos específicos contra ApxIV presentes na amostra. O resultado é obtido comparando-se a densidade óptica (DO) que se desenvolve nas cavidades que contêm as amostras com a DO das cavidades que contêm o controle reagente positivo.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ