

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Diagnóstico comparativo de *Mycoplasma hyopneumoniae*  
em Suínos de Terminação ao Abate**

MARIA ANGELA TEIXEIRA

CURITIBA  
2006

MARIA ANGELA TEIXEIRA

**Diagnóstico comparativo de *Mycoplasma hyopneumoniae*  
em Suínos de Terminação ao Abate**

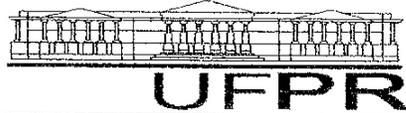
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Veterinária.

Orientador: Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2006

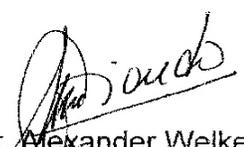
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



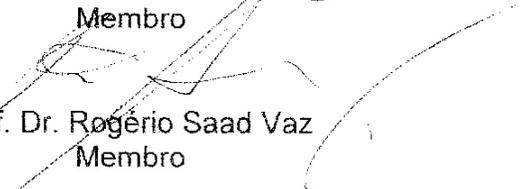
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO AO ABATE”** apresentada pela Mestranda MARIA ANGELA TEIXEIRA, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APROVADA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 31 de agosto de 2006.

  
Prof. Dr. Alexander Welker Biondo  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton  
Membro

  
Prof. Dr. Rogério Saad Vaz  
Membro

Dedico aos meus filhos  
Gabriela, Artur e Pedro.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, pela orientação e apoio.

Ao Dr. Nelson Mores e à Dra. Jalusa Deon Kich, da EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC), pela disponibilidade na realização dos testes de ELISA e Imuno-histoquímica.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia Veterinária, pela oportunidade em dar continuidade à minha formação profissional, e aos professores pelos ensinamentos e amizade.

À Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná por conceder a autorização para fazer o curso de Pós-Graduação.

À Coordenação do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” pelo apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

À Regina, pela paciência, amizade e ensinamentos ao longo deste trabalho.

À Rosária, pela sabedoria, sinceridade, estímulo nos momentos finais.

À Cristina, pela dedicação em compartilhar toda a sua experiência profissional.

À Mara Eliza, pela constante colaboração, sugestões e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, pelo carinho e incentivo, que colaboraram com a execução do projeto de mestrado.

Às amigas do Laboratório de Biologia Molecular - Secretaria de Estado da Saúde - LACEN, pela acolhida e atenção, durante o desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1 ETIOLOGIA .....	3
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	4
2.3 SOROCONVERSÃO .....	5
2.4 PATOGENIA .....	6
2.5 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES .....	9
2.6 DIAGNÓSTICO .....	10
2.7 CONTROLE DAS DOENÇAS NAS GRANJAS .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1 AMOSTRAS .....	14

<b>3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE- (PCR).....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 ELISA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....</b>	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 HISTOPATOLÓGICO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3 OPTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE- (PCR).....</b>	<b>21</b>
<b>4.4 ELISA E PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>8.ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

**LISTA DAS ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

ATCC	American Type Culture Collection
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
CNPISA	Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético; sal dissódico
ELISA	Enzima-linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GRSC	Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas
HCl	Ácido clorídrico
IN	Instrução Normativa
IHQ	Imuno-histoquímica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

N-PCR	Nested- PCR
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PES	Pneumonia Enzoótica Suína
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomolar
PMS	Pneumonia Micoplasmática Suína
Rpm	Rotações por minuto
Rnase	Enzima que degrada RNA
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
TEB	Tris, EDTA, ácido bórico
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U (Taq Polimerase)	Unidade que incorpora 10nmol de DNA em 30 minutos a 74°C.
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius
10x	10 vezes a concentração de uso

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Dados individuais comparativos de diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* por ELISA indireto, PCR, microscopia e macroscopia de pulmão 61 suínos ao abate.....29
- Tabela 2. Resultado de amostras de pulmão proveniente de suínos ao abate testadas na Imuno-histoquímica (IHQ) para *Mycoplasma hyopneumoniae* .....31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Porcentagem de lesões sugestivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, em exame macroscópico, para amostras de pulmão de 61 suínos em fase de terminação..... 19
- Figura 2. Porcentagem de lesões sugestivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, em exame histopatológico, para amostras de pulmão de 61 suínos em fase de terminação.....20
- Figuras 3 - 7. Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 3 Parênquima pulmonar sem alterações [x 20]; 4 Atelectasia alveolar [x 20]; 5, Exsudato inflamatório alveolar, com edema, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas [x 10]; 6, Detalhe do exsudato inflamatório alveolar, (seta) célula gigante multinucleada [x 10]; 7, Visão panorâmica, Pneumonia Enzoótica Suína [x 10].....23
- Figuras 8 - 12. Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 8, Bronquíolo sem alteração [x 40]; 9, Bronquíolo, espessamento da lâmina própria [x 20]; 10, Brônquio, espessamento da lâmina própria [x 20]; 11, Brônquio, espessamento e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria [x 5]; 12, Detalhe do brônquio com espessamento e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria [x 40].....24
- Figuras 13 - 17. Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 13, Infiltrado linfoplasmocitário perivascular moderado [x 20]; 14, Infiltrado linfoplasmocitário perivascular severo [x 20]; 15, Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar e perivascular [x 20]; 16, Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar discreto [x 40]; 17, Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar severo [x 20].....25

- Figuras 18 - 21. Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 18, Hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolos discreta [x 10]; 19, Hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolo moderada [x 10]; 20, Hiperplasia de tecido linfóide associado a brônquio severa [x 10]; 21, Hiperplasia do tecido linfóide associados a bronquíolos severa [x 10].....26
- Figura 22 - 25. Produto amplificado por PCR em amostras clínicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* [1 - 13]. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de massa molecular (100pb DNA Ladder - Invitrogen™); B: Branco; CP: Controle positivo (EMBRAPA).....27
- Figura 26 - 29. Produto amplificado por PCR em amostras clínicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* [1 - 13]. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de massa molecular (100pb DNA Ladder - Invitrogen™); B: Branco; CP: Controle positivo (EMBRAPA).....28
- Figuras 30 - 33. Pulmão suíno. Técnica de coloração imuno-histoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae*. 22, Controle negativo; 23, Controle positivo; 24, Reação fracamente positiva; 25, Reação fortemente positiva [x 100].....33

## RESUMO

A Pneumonia Enzoótica Suína é uma doença de ampla distribuição e impacto na suinocultura brasileira e mundial causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença deste agente no pulmão de suínos em fase de terminação no momento do abate, bem como correlacionar as lesões macro e microscópicas pulmonares características com os resultados da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a prova sorológica do ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram utilizadas 61 amostras de fragmentos de pulmão de suínos, em fase de terminação, e avaliadas por exame anatomopatológico e pela PCR e por histopatologia e imuno-histoquímica. Respectivas amostras de soro foram colhidas para serem utilizadas no ELISA indireto. Do total de 61 amostras avaliadas, apenas 11 (18%) não apresentaram lesões aparentes ao exame macroscópico; as outras 50 (82%) exibiram alterações circulatórias caracterizadas por áreas com coloração avermelhadas nas regiões antero-ventrais e áreas hepatizadas de coloração variando de púrpura ao cinza nas porções dos lobos apicais. Essas áreas eram bem definidas, com clara delimitação do parênquima pulmonar. Do total de amostras, 58 (95,1%) foram consideradas compatíveis para PES na microscopia e apresentaram diferentes alterações histológicas sugestivas de *Mycoplasma hyopneumoniae* em diferentes estágios da doença. Apenas três amostras (4,9%) apresentaram lesões pouco sugestivas à infecção. No exame imuno-histoquímico, das 14 amostras testadas, apenas quatro (30%) foram positivas, com diferentes graus de lesão na imuno-marcação. Do total de amostras, 47 (77%) foram consideradas reagentes pelo teste de ELISA. A concordância entre o ELISA e a PCR no diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* foi de 78,7%. O uso da combinação de técnicas laboratoriais para a detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* foi importante para o correto diagnóstico das amostras avaliadas. A PCR confirmou sua importância como ferramenta segura no diagnóstico molecular de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

## ABSTRACT

Swine Enzootic Pneumonia is a wide spread disease of impact on the Brazilian and worldwide Swine Meat Production caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*. The aim of the present study was to evaluate the presence of this agent in the lung tissue of termination pigs at the slaughterhouse, as well as to correlate the macro and microscopic pulmonary characteristic lesions with Polymerase Chain Reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 61 samples of pulmonary fragments from termination phase pigs were utilized, and evaluated by gross pathology exams and PCR; histopathology and immuno-histochemistry. Respective serum samples were also collected and used for indirect ELISA. Out of the total 61 evaluated samples, only 11 (18%) did not present apparent lesions at the gross pathology exam; the other 52 (82%) presented circulatory lesion characterized by reddish areas on the anterior ventral regions and also hepatized areas on apical lobes with color varying from purple to grey. These areas were well defined, with clear border of pulmonary parenchyma. Out of the total, 58 (95.1%) were considered positives on the macroscopy and presented different histological alterations of suggestive lesions by *Mycoplasma hyopneumoniae* in different stages of the disease. On the immuno- histochemistry exam, out of 14 samples tested, only four (30%) were considered positives, with different degrees of lesion on slides. Out of the total, 47 (77%) samples were considered reagent by ELISA test. The agreement of ELISA and PCR in the diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* was of 78.7%. The combined use of laboratory techniques for the *Mycoplasma hyopneumoniae* detection was important for properly diagnosis of the evaluated samples. The PCR confirmed its importance as reliable tool for molecular diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil constitui atualmente uma atividade organizada, presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais existentes no país. O rebanho suíno brasileiro, estimado em 36,5 milhões de cabeças, tem a sua maior representação numérica, econômica e tecnológica na Região Sul, a qual abriga mais de 42 % do rebanho nacional (IBGE, 2005).

A suinocultura paranaense tem uma participação de 27% em relação ao rebanho nacional e de 64% em relação ao rebanho da Região Sul do país. (PARANÁ, 2006).

A prevenção de doenças é uma das maiores ferramentas de atuação na suinocultura tecnificada. Impedir a entrada de patógenos numa granja suína pode ser a diferença entre o sucesso e o fracasso desta atividade, sendo o diagnóstico um ponto crítico nesta prevenção.

Com o intuito de prevenir a entrada de patógenos, medidas de biossegurança são cada vez mais aplicadas nas granjas suínolas brasileiras. A biossegurança significa a implantação de normas rígidas, com o objetivo de proteger o rebanho contra a introdução de vários agentes infecciosos (TEIXEIRA & VALLE, 1998).

Dentro deste contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Secretaria de Defesa Agropecuária, estabeleceu normas, segundo a Instrução Normativa 19/2002 do MAPA (BRASIL, 2002) para Granjas de Reprodutores de Suídeos Certificadas (GRSC). Estas normas foram redigidas considerando-se a importância econômica da suinocultura e a necessidade de manter um nível sanitário adequado nas granjas que comercializam, distribuem ou mantêm reprodutores suídeos para a multiplicação animal, a fim de evitar a disseminação de doenças e assegurar níveis desejáveis de produtividade.

Para o desenvolvimento e implantação destas normas faz-se necessário o amplo conhecimento das doenças, do diagnóstico dos seus agentes e formas de prevenção. Deste modo, o presente estudo visou comparar técnicas de diagnóstico para o *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos na fase de terminação, no momento do abate.

## **1.1. OBJETIVO GERAL**

Realizar estudo comparativo entre técnicas de diagnóstico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos na fase de terminação, ao abate.

## **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**1.2.1.** Optimizar a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae*, proveniente de lesões pulmonares de suínos de terminação, da região metropolitana de Curitiba – PR.

**1.2.2.** Comparar os resultados obtidos pela técnica de PCR com os obtidos pelas técnicas de ELISA, imuno-histoquímica, e análise macroscópica e histopatológica dos pulmões de suínos em fase de terminação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ETIOLOGIA

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o principal patógeno da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), 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.*, 1999; THACKER *et al.*, 1999).

Os micoplasmas são diferenciados fenotipicamente de outras bactérias pelo pequeno tamanho e ausência de parede celular. Pertencem à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* que é composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteoroplasma*, *Mycoplasma*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (WALKER, 2003). A maioria dos membros desta classe é patogênica e coloniza uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais, plantas e insetos. Somente os membros dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são importantes em medicina veterinária. Os micoplasmas são os menores microrganismos de vida livre autoreplicantes conhecidos, possuem genomas pequenos (580 a 1350 kb), com baixo conteúdo de guanina+citosina (23-40%) e são filogeneticamente relacionados aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (MANILOFF, 1992). A ausência da parede celular proporciona um extremo pleomorfismo, podendo variar de esférico a bacilar e de filamentosos a helicoidal, sendo que suas colônias apresentam aspecto de “ovo frito” (TULLY *et al.* 1993). O diâmetro da forma esférica varia de 0,3 a 0,8µm e possui uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana. Coram-se de forma insatisfatória pelo método de Gram, sendo recomendadas as colorações de Giemsa, Casteñeda, Dienes e azul de metileno. Os micoplasmas crescem lentamente em meio de cultivo após incubação de dois a três dias, a temperatura ótima de 37°C, pH em torno de 7,5 atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> e leve agitação (WALKER, 2003). Possuem alta sensibilidade aos detergentes e às alterações osmóticas, são naturalmente resistentes a antibióticos que interferem na síntese da parede celular como o grupo das penicilinas (RAZIN, 1985; MAES, 1996).

Os micoplasmas são de difícil cultivo “in vitro”, sendo que a maioria das espécies nunca foi cultivada (RAZIN *et al.*, 1998). O *M. hyopneumoniae*, por outro lado, é cultivável “in vitro”, porém exige meio enriquecido. Este fato, somado ao seu crescimento pobre e lento (ROSS, 1999; SOBESTIANSKY *et al.*, 1999; WALKER, 2003), encarece excessivamente a produção de vacinas preparadas com bactérias inteiras inativadas (bacterinas), que são as utilizadas no controle da PES (ROSS, 1999; FAGAN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2001). O *M. hyopneumoniae* geralmente é cultivado em meio Friis (FRIIS, 1975).

Ao contrário dos micoplasmas patogênicos para o homem (*Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma pneumoniae*) que são intracelulares, o *M. hyopneumoniae* é um microrganismo extracelular. O isolamento deste microrganismo tornar-se difícil devido a sua natureza fastidiosa e também pela freqüente presença de *Mycoplasma hyorhinis* no trato respiratório suíno, causador de poliserosites e artrites; bem como de *Mycoplasma flocculare*, espécie não patogênica que apresenta semelhanças em relação à morfologia, crescimento e antigenicidade ao *M. hyopneumoniae* (ROSS, 1999).

## 2.2. EPIDEMIOLOGIA

A Pneumonia Enzoótica Suína é uma doença multifatorial caracterizada por baixa mortalidade e alta morbidade, período de incubação de 10 à 21 dias, sua gravidade e importância econômica na granja está associada à variações climática, sistema de produção utilizado e ao manejo (KOBISCH *et al.* 2000). Fatores climáticos como temperatura, umidade, volume de ar, ventilação e gases, juntamente com sistemas de produção contínua e falta de higiene, aumentam o risco de ocorrência de PES nas granjas (SCHWARTZ, 2001).

A forma clínica da doença é mais comum nos animais em crescimento e terminação, mas em rebanhos sem imunidade, a doença pode afetar leitões já a partir de duas semanas de idade, bem como animais em fase de reprodução (STÄRK, 2000).

O *M. hyopneumoniae* pode ser transmitido de forma direta através do contato com secreções do trato respiratório de suínos infectados, e indireta através de aerossóis (PIFFER, 1983). Animais sadios colocados em baias adjacentes com

animais infectados por *M. hyopneumoniae* apresentaram a PES (SHELDRAKE *et al.* 1990). Estudo feito por KUNDSIN (1965) mostrou que os micoplasmas podem estar viáveis em aerossóis, segundo SOBESTIANSKY *et al.* (1994), em distância de até 3,5 km entre granjas com mais de 500 suínos a transmissão por aerossóis foi observada. Recentemente, através de técnicas de biologia molecular, foi identificado *M. hyopneumoniae* no ar de granjas com presença de PES (STARK *et al.*, 1998).

Quando a infecção é introduzida na granja, o período de latência pode variar de quatro a seis semanas, podendo em alguns casos chegar a dois ou três anos. Por outro lado, em granjas infectadas o período de latência é variável, podendo não ocorrer manifestação dos sinais clínicos (SOBESTIANSKY *et al.*, 1994).

Segundo ROSS (1986), as matrizes de primeira cria se infectam e permanecem portadoras por mais tempo do que as adultas, pois devido à baixa imunidade, eliminam excretam mais microrganismos do que as matrizes com maior número de gestações. A transmissão intrauterina ou através do leite não foi observada (PRIKAZSKY, 1988).

### **2.3. SOROCONVERSÃO**

A soroconversão depende do período de maior difusão do agente, do gerenciamento dos fatores estabelecidos nas granjas e do ensaio sorológico adotado (MAES, 1996).

Têm sido relatados diferentes graus de correlação entre o tempo de soroconversão e lesões pulmonares macroscópicas (FALK & LIUM 1991, YAGIHASHI *et al.*, 1993; MORRIS *et al.*, 1995; SITIJAR *et al.*, 1996; LEON *et al.*, 2001). O tempo decorrido entre o início de sinais clínicos ou presença de lesão pneumônica para soroconversão parece ser maior em suínos naturalmente infectados, comparados com suínos infectados experimentalmente. A demora de aproximadamente oito semanas entre o pico de pneumonia e soroconversão tem sido descritos (SUTER., 1985; YOUNG & ROSS, 1987; SITIJAR *et al.*, 1996). Este fato, foi atribuído ao caráter pouco invasivo do *Mycoplasma hyopneumoniae* e conseqüente detecção de anticorpos IgG no teste sorológico (SITIJAR *et al.*, 1996).

Soroconversão tem sido correlacionada não somente com lesões de pneumonia, mas também com a extensão destas lesões (KOBISCH *et al.*, 1993; SITIJAR *et al.*, 1996). ANDREASEN *et al.*, (2001), concordando com SITIJAR *et al.*, (1996), relatam que, suínos soroconvertidos para *M. hyopneumoniae* próximo ao abate, mostraram uma severa pneumonia catarral.

Existe controvérsia entre relação da soroconversão com o ganho de peso em suínos. WALLGREN *et al.*, (1998) relataram que suínos soroconvertidos em estágios iniciais de desenvolvimento tendem a ter um decréscimo no ganho de peso. Entretanto, outros autores relatam que a pneumonia ocorrendo em estágios de desenvolvimento posteriores aos iniciais tem um impacto maior no ganho de peso (CHRISTENSEN *et al.*, 1999; SITIJAR *et al.*, 1996). No entanto, diferenças não significativa entre suínos soronegativos e soropositivos também são relatados por MORRIS *et al.*, (1995) e ANDREASEN *et al.*, (2001).

## 2.4. PATOGENIA

A maioria dos membros da ordem *Mycoplasmatales*, o *M. hyopneumoniae* apresenta estreita especificidade quanto ao hospedeiro, infecta uma única espécie, a suína, colonizando o trato respiratório provocando danos aos cílios e ao epitélio da cavidade respiratória. Uma característica da PES é a cronicidade, porém igualmente importante é a habilidade que *M. hyopneumoniae* possui de alterar ou desviar a resposta imune e predispor o suíno às infecções secundárias (CIPRIAN *et al.*, 1988; DEBEY & ROSS, 1994; THACKER *et al.*, 1999). Algumas espécies de micoplasmas patogênicos, como *M. hyorhinis*, *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma gallisepticum* possuem uma complexa genética capaz de alterar os seus antígenos de superfície através de mecanismos como variação de fase e de tamanho, e mascaramento de epítomos de proteínas de superfície (RAZIN *et al.*, 1998). DJORDJEVIC *et al.* (2004) demonstraram que a adesina P97 de *M. hyopneumoniae* é seletivamente clivada após a sua tradução, gerando subprodutos com diferentes tamanhos.

Heterogeneidade entre as cepas de *M. hyopneumoniae* foi observada através de teste de inibição do metabolismo, digestão com enzimas de restrição, PCR, perfil total de proteínas e de glicoproteínas (DESROSIERS, 2001). VICCA *et al.* (2003)

encontraram uma alta variação de virulência nas cepas de *M. hyopneumoniae*. Segundo aqueles autores, as cepas de moderada ou alta virulência apresentaram uma banda de 5000pb, determinada através de *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), que estava ausente nas cepas de baixa virulência.

A caracterização antigênica de cepas de determinados patógenos é essencial para a seleção de antígenos vacinais adequados e deve ser realizada periodicamente, tendo em vista a constante mudança de perfil antigênico das cepas prevalentes (CONCEIÇÃO & TURNES, 2003; CONCEIÇÃO *et al.*, 2003).

Micoplasmas patogênicos utilizam um mecanismo de patogenicidade complexo, envolvendo adesão e colonização, citotoxicidade, competição por substratos, evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro (RAZIN *et al.*, 1998; ROSS, 1999). Entretanto, a base molecular da patogenicidade de alguns micoplasmas sugere que o dano provocado nesses hospedeiros se deve à própria resposta imune e inflamatória, ao invés do efeito tóxico direto causado pelos componentes celulares destes microrganismos (RAZIN *et al.*, 1998). Com o seqüenciamento da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae*, foram identificados oito genes para proteases, 53 genes para lipoproteínas (8,5% do genoma) e seis genes homólogos a adesina P97 que poderiam contribuir para a persistência e virulência do agente (MINION *et al.*, 2004). Proteases estão ligadas à virulência de bactérias Gram positivas (TORTORA *et al.*, 2000), sendo que uma ou mais delas poderiam estar envolvidas no processamento pós-traducional da adesina P97, que é um fator de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* bem caracterizado (DJORDJEVIC *et al.*, 2004). Lipoproteínas, que são os principais componentes de membrana de micoplasmas, compreendem aproximadamente 2/3 da massa total da membrana e são elas que normalmente sofrem uma variação antigênica frente à resposta imune do hospedeiro (RAZIN *et al.*, 1998). Por outro lado, a função dos genes homólogos à adesina P97 é desconhecida e provavelmente não está relacionada com a adesão, uma vez que, apenas um deles possui o domínio repetitivo R1 responsável pela ligação ao receptor ciliar (MINION *et al.*, 2000; MINION *et al.*, 2004). Cepas com baixa capacidade de aderência ao cílio das células epiteliais do trato respiratório suíno não são patogênicas; com exceção da adesina ciliar P97, outros fatores de patogenicidade não têm sido claramente estabelecidos em *M. hyopneumoniae*.

(ZIELINSKI & ROSS, 1993). A adesina P97, identificada por ZHANG *et al.* (1995), reconhece receptores glicolipídicos sulfatados presentes nos cílios das células epiteliais do trato respiratório suíno (ZHANG *et al.*, 1994). HSU & MINION (1998) identificaram o epítipo da P97 que é responsável pela ligação ao receptor ciliar, uma seqüência repetitiva de cinco aminoácidos que é altamente imunogênica e que está localizada na porção terminal da proteína, designada região R1. Cepas de *M. hyopneumoniae* com variação no número de repetições da região R1 foram identificadas por WILTON *et al.*, 1998, sugerindo que esta variação poderia influenciar a capacidade de ligação ao cílio do trato respiratório suíno.

Após aderir-se aos cílios da traquéia, brônquios e bronquíolos, *M. hyopneumoniae* inicialmente paralisa e depois destrói estas estruturas, predispondo os suínos às infecções secundárias (DEBEY&ROSS, 1994). *M. hyopneumoniae* interage com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ; IL-1e IL-6) responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide perivascular e peribrônquica características da PES, sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões (RODRIGUEZ *et al.*, 2004). MESSIER & ROSS (1991) evidenciaram que esses microrganismos possuem fatores mitogênicos para linfócitos, os quais seriam responsáveis pela hiperplasia do tecido linfóide peribronquiolar característica da doença. Os micoplasmas são considerados super-antígenos (MIMS *et al.*, 1995), capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T (RAZIN *et al.*, 1998) escapando das defesas naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à mucosa respiratória (YAMAMOTO, 1994), podendo sua localização no lúmen explicar a dificuldade de eliminação do agente.

Outros aspectos da patogenia da PES têm sido identificados. SCHMIDT *et al.* (2004) identificaram em *M. hyopneumoniae* uma lipoproteína de superfície imunodominante P65 que é especificamente reconhecida durante a infecção. A P65 pertence à família de enzimas lipolíticas, embora a sua função fisiológica e ou patogênica ainda não tenha sido elucidada, pode desempenhar uma importante função nutricional, sendo responsável pela aquisição de ácidos graxos de cadeia longa e também por reduzir a função de surfactantes pulmonares, favorecendo a atelectasia dos alvéolos.

## 2.5. SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

Os sinais clínicos da PES variam com a presença ou ausência de outras infecções respiratórias e das condições ambientais. O sinal clínico mais comum é a tosse seca crônica, mas muitos animais não manifestam sinais clínicos aparentes, porém podem apresentar desenvolvimento mais lento (KOBISCH, 1996). Em propriedades acometidas pela doença é comum observar grandes disparidades de desenvolvimento entre leitões da mesma faixa etária (PIFFER, 1983).

No pulmão, as lesões macroscópicas da PES são constituídas por zonas de consolidação, sendo que a localização da lesão coincide com o caminho que o ar faz ao entrar no pulmão (FEENESTRA *et al.*, 1994). Na maioria dos suínos, as lesões afetam apenas porções dos lobos craniais e acessórios, mas em suínos mais intensamente afetados, as lesões podem envolver 50% ou mais das porções crânio ventrais do pulmão. Os pulmões afetados são vermelho-escuros nos estágios iniciais e nos estágios mais crônicos da doença têm um aspecto cinza-pálido homogêneo. Na superfície de corte, o exsudato é facilmente expulso das vias aéreas por pressão, dependendo do estágio das lesões e das infecções secundárias (CARLTON *et al.*, 1998).

Microscopicamente, nos estágios iniciais da doença, observa-se perda de cílios, esfoliação e discreto acúmulo de neutrófilos ao redor das vias aéreas; com a evolução da doença, há um aumento de número de linfócitos nos espaços peribrônquiais, peribronquiolares e perivasculares (ROSS, 1999). Casos agudos podem mostrar discreta hiperplasia linfóide e um exsudato alveolar predominantemente neutrofílico (TAYLOR, 1996). No estágio crônico da doença, há hiperplasia linfóide ou manguitos e conseqüentemente espessamento dos septos interalveolares. Por outro lado, colapso alveolar, enfisema alveolar e nódulos linfóides podem ser observados em lesões em resolução (ROSS, 1999). A hiperplasia linfóide pode estar relacionada aos sinais clínicos, porque a pressão dos agregados de tecido linfóide pode obliterar o lúmen dos bronquíolos e causar colapso dos alvéolos adjacentes (BAKERSVILLE, 1981). Essas lesões não são totalmente específicas da PES, porém são extremamente sugestivas da doença e, nos casos em que há complicações bacterianas, a exsudação neutrofílica é

abundante no interior dos alvéolos, dos bronquíolos e dos brônquios (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

## 2.6. DIAGNÓSTICO

Diante da natureza, da especificidade e da complexidade dos fatores envolvidos com essa doença é importante o diagnóstico rápido e preciso da pneumonia enzoótica suína, sobretudo do(s) agente(s) etiológico(s) envolvido(s) (LE POTIER *et al.*, 1994). Graças às características singulares dessa enfermidade, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela conjunção dos sinais clínicos e dos aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões (AHRENS & FRIIS, 1991; ROSS & STEMKE, 1995; DONE, 1996). Todavia, esse procedimento possui uma parcela de subjetividade e de imprecisão, sendo necessários exames complementares para a confirmação do diagnóstico. A fim de se evitar diagnóstico não conclusivo e controverso sobre a etiologia do processo, muitas vezes o cultivo e o isolamento do agente tornam-se necessários. No entanto, por se tratar de um microrganismo de caráter fastidioso, de crescimento lento e que requer meio seletivo, complexo e de alto custo para o seu crescimento, as técnicas para seu isolamento não são rotineiramente utilizadas. Além disso, a utilização de antibióticos e outros quimioterápicos na alimentação pode também mascarar e comprometer os resultados desse procedimento microbiológico (HURNIK *et al.*, 1993).

O diagnóstico pode ser realizado com base nas observações clínicas, nas lesões de necropsia e nos exames histopatológicos. A confirmação é realizada pelo isolamento do agente etiológico, entretanto, a técnica é laboriosa, demorada, tornando sua aplicação restrita. A imunoperoxidase (imuno-histoquímica) em cortes histológicos usando anticorpo policlonal, é uma prova eficiente e prática, mas apresenta o inconveniente de reagir com determinantes antigênicos de outros micoplasmas (*M. flocculare*, *M. hyorhinis*). A imunofluorescência foi ocasionalmente utilizada para o diagnóstico de pneumonia enzoótica por ser simples e prática. Contudo, existem restrições ao seu uso, uma vez que requer amostras recentes do material examinado (ARMSTRONG, 1994). Para detecção de anticorpos, no soro sanguíneo de suínos, em monitorias sorológicas ou estudos de prevalência, técnicas

sorológicas como ELISA, possuem alta sensibilidade. No entanto, devido às reações cruzadas com *M. flocculare*, possuem limitações quanto à sua utilização, sendo que os métodos sorológicos detectam os títulos de anticorpos, mas não confirmam a ocorrência da infecção (ROSS & STEMKE, 1995).

Os inconvenientes das técnicas citadas estimulam a busca de métodos compatíveis com os processos diagnósticos de rotina. Adicionalmente, em determinadas circunstâncias torna-se necessária à utilização de técnicas que possuam alta especificidade, capazes de detectar determinantes antigênicos envolvidos com a gênese do processo. A sensibilidade do método de diagnóstico pode vir a ser importante ferramenta, capaz de detectar um possível início de enfermidade, antes mesmo que a doença clínica se manifeste. Com os avanços da biologia molecular, os métodos baseados na aplicação de tecnologia do DNA recombinante como hibridação de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), estão sendo utilizados para detecção do *M. hyopneumoniae* (STEMKE, 1989; AHRENS & FRIIS, 1991; ABIVEN *et al.*, 1992; FUTTO *et al.*, 1992). Os primers espécie-específico utilizados são complementares às seqüências conservadas do gene 16S do rRNA do *M. hyopneumoniae*. Os primers externos (PCR) foram descritos por MATTSON *et al.* (1995) e os internos por CALSAMIGLIA *et al.* (1999).

Vários trabalhos descrevem a utilização da técnica por PCR no diagnóstico do *Mycoplasma* spp. em amostras biológicas como swab nasal, lavabo traqueal e tecido pulmonar. Estes trabalhos demonstraram uma alta sensibilidade e especificidade da técnica, tornando a identificação do agente mais rápida e precisa (MATTSSON *et al.*, 1995; BACCARO *et al.*, 1999; VERDIN *et al.*, 2000).

YAMAGUTI (2003) utilizando N-PCR para a detecção de *M. hyopneumoniae* com cepa de referência do *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934), mostrou uma sensibilidade de  $8 \times 10^{-8}$  µg/µl ou 80 fentogramas (fg) de DNA. Para avaliação da especificidade da N-PCR, YAMAGUTI (2003) utilizou microrganismos freqüentemente encontrados no trato respiratório dos suínos: *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934), *M. hyorhinis* (ATCC 17981), *M. hyosynoviae* (ATCC 25591), *M. flocculare* (MF) (ATCC 27716), *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5B cepa L20, *Haemophilus parasuis* S1 (Nr4p<sup>2</sup>), *Haemophilus parasuis* S2 (SW140 p<sup>2</sup>), *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*. O resultado do teste de

especificidade mostrou que somente na amostra padrão do *M. hyopneumoniae* foi visualizado uma banda com produto de aproximadamente 352 pb e nenhum outro fragmento de amplificação, deste tamanho, foi observado nas outras amostras utilizadas neste teste.

Segundo TANG *et al* (1997) uma segunda amplificação aumenta a sensibilidade da PCR, devido ao duplo processo de amplificação, melhorando ainda mais a identificação do agente. VERDIN *et al* (2000) utilizaram a Nested-PCR e encontraram uma sensibilidade de um fentograma, equivalente a um microrganismo, mostrando a eficiência desta técnica.

BLANCHARD *et al* (1992) utilizando PCR para a detecção de *M. hyopneumoniae* em amostra de lavado traqueal de suínos inoculados experimentalmente, mostraram uma sensibilidade de  $4 \times 10^2$  microrganismos.

YAMAGUTI (2003) e YAMAGUTI *et al.* (2003) comparando swabs tonsilares e nasais e concluíram que swabs tonsilares mostraram maior número de amostras positivas por Nested - PCR em relação ao swabs nasais. Segundo estes autores, as amostras de swabs nasais podem ter sofrido interferência da presença de sangue originada de lesões provocadas durante a colheita ou pré-existentes (irritantes, agentes patológicos), podendo levar a uma inibição e ou um aumento de DNA não micoplasmal.

## **2.7.CONTROLE DE DOENÇAS NAS GRANJAS**

O controle de doenças nas granjas é efetuado por meio da vigilância das principais enfermidades que afetam o rebanho, com medidas sanitárias, diagnóstico precoce e específico, controle de importações, registro e venda de reprodutores e movimentação dos suínos para as diversas finalidades. Para estabelecer regras neste controle sanitário, foi criada uma metodologia de certificação da sanidade do rebanho.

Esta metodologia para certificação de granjas de reprodutores de suídeos exige o cumprimento de normas, segundo a Instrução Normativa 19/2002 do MAPA (Brasil, 2002) (Anexo I). Esta certificação envolve formas sistemáticas e periódicas de constatar, qualificar e quantificar o nível de saúde de granjas de reprodutores

para determinada doença ou infecção. As doenças obrigatórias monitoradas para certificação como GRSC são a Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky, Brucelose, Tuberculose, Leptospirose e Sarna. A critério do proprietário da granja de reprodutores, este poderá requerer junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a certificação opcional de livre de Rinite Atrófica Progressiva, Pneumonia Enzoótica Suína, Pleuropneumonia Suína e Disenteria Suína, sendo essas doenças de certificação opcional como GRSC.

Após o cumprimento dos critérios para certificação, a granja é declarada GRSC e entra no processo de manutenção da certificação. Para a manutenção desta, os exames deverão ser repetidos a cada seis meses (uma única vez), com todos os resultados negativos, com exceção da Leptospirose que pode ser controlada através de vacinação comprovada.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. AMOSTRAS**

A colheita do material deste estudo foi realizada no Frigorífico Bel Paladar, na região metropolitana de Curitiba. A amostragem foi realizada nos meses de fevereiro, março e maio de 2006.

Como procedimento de abate sanitário, os animais foram mantidos por 24 horas em currais com livre acesso à água limpa. Posteriormente, os animais foram contidos, banhados com água e conduzidos à insensibilização por choque elétrico, seguido de sangria pela secção dos grandes vasos do pescoço.

Foram utilizados 61 suínos em fase de terminação, com idade entre cinco a seis meses, pesando cerca de 100 quilogramas, selecionados ao acaso na linha de abate, sendo que cada animal foi devidamente identificado com tatuagem na orelha direita.

As amostras de sangue para análise sorológica de ELISA foram colhidas durante a sangria, sendo o sangue acondicionado em frascos estéreis de 10mL identificados com o número da tatuagem, de acordo com a descrição acima. Os fragmentos de pulmão para PCR, exame histopatológico e exame imunohistoquímico, foram colhidos na linha de abate. Na fase de evisceração, o pulmão de cada animal devidamente identificado, foi examinado macroscopicamente, colhido um fragmento o qual foi acondicionado em embalagens plásticas individuais devidamente identificadas e mantidas sob refrigeração.

No laboratório, as amostras foram aliqüotadas em fragmentos com espessura de cerca de um centímetro, utilizando instrumental flambado para cada amostra. As alíquotas para as análises de PCR foram acondicionados em microtubos de 2,0mL e mantidos a 80°C negativos e as destinadas para os exames histopatológico e imunohistoquímico foram acondicionados em formol 10%.

### 3.2. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os pulmões foram avaliados macroscopicamente por inspeção anatomopatológica e os aspectos morfológicos anotados em protocolo próprio, classificando em áreas com e sem lesões.

### 3.3. EXAME HISTOPATOLÓGICO

As amostras foram processadas segundo técnicas rotineiras em histopatologia e coradas pela Hematoxilina & Eosina (H&E) (Anexo II), no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”.

Os cortes histológicos foram examinados em microscópio óptico e, de acordo com o aspecto microscópico das alterações observadas, foram classificadas conforme SOBESTIASNKY *et al.* (1999) e descritas a seguir: Infiltração plasmocitária progressiva ao redor das vias aéreas e dos vasos sanguíneos, exsudação intra-alveolar de macrófagos pulmonares, neutrófilos e edema intra-alveolar. Dependendo da evolução da doença, podem ser encontradas diferentes características histológicas das lesões como:

- Fase 1 - aguda precoce - infiltração peribronquiolar de linfócitos e presença de infiltrado celular no lúmen de alvéolos e dos bronquíolos,
- Fase 2 - aguda tardia - proliferação linfóide, estendendo-se através da lâmina própria dos bronquíolos e ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos e dos bronquíolos,
- Fase 3 - sub-aguda – discreta à moderada hiperplasia de folículos linfóides peribronquial e peribronquiolar, ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos, brônquios e bronquíolos, e espessamento da parede alveolar,
- Fase 4 - crônica – severa hiperplasia dos folículos linfóides peribronquiais e peribronquiolares, provocando estenose dos brônquios e dos bronquíolos, com áreas de atelectasias e ausência de infiltrado no lúmen dos alvéolos.

Os cortes histológicos foram fotografados através de um sistema de captura de imagem de composto de câmera digital (Sony) acoplada em microscópio óptico (Zeiss).

### 3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As análises de PCR foram realizadas no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”. Para extração do DNA de *M. hyopneumoniae* das amostras clínicas foi utilizado o método clássico de Fenol-Clorofórmio-Etanol com modificações, conforme descrito no Anexo III. Para extração do DNA do padrão positivo (ATCC adquirida da EMBRAPA) foi utilizado o método clássico físico “choque térmico” (Anexo IV). A quantificação do DNA de cada amostra foi efetuada por espectrofotometria (WPA Fotômetro – UV1101), com absorvância de 260-280nm.

A reação da PCR foi conduzida em um volume final de 50µL, sendo 5µL da amostra de DNA, independente da concentração de DNA, e 45 µL de PCR-mix contendo: uma (01) U de Taq DNA polimerase, 1x PCR buffer [20mM Tris HCl (pH 8,4); 50mM KCl], e 0,66 mM de dNTPs, e 0,5µM de cada um dos primers externos (649 pb) *Mh* up (forward) e *Mh* do (reverse). Na reação da NESTED-PCR foram utilizados 2µL do produto da primeira amplificação (PCR) e 48µL do N-PCR mix contendo os mesmos componentes e concentrações descritas acima, com exceção dos primers, que desta vez foram utilizados os internos (352 pb) *NMh* up (forward) e *NMh* do (reverse). Como controle positivo foi utilizado a cepa de referência do *M. hyopneumoniae* (EMBRAPA Suíno e Aves). O controle da qualidade da amplificação foi realizado através de uma reação contendo todos os componentes com exceção do DNA alvo.

Em função das reações inespecíficas quando utilizado os ciclos de amplificação proposto por YAMAGUTI (2003) [desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, hibridização a 65,5°C PCR 59,5°C N-PCR por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção em refrigeração tanto para PCR quanto para Nested-PCR] foram testadas diferentes concentrações MgCl<sub>2</sub> [1,25mM;

1,5mM e 1,75mM] e de temperaturas de hibridização [54°C, 55°C, 56°C, 57°C e 58°C]. Estes parâmetros foram analisados mantendo-se constantes as concentrações dos demais componentes da reação de PCR. O processo de amplificação foi realizado em termociclador Mastercycler Gradiente Eppendorf.

Também foram testadas diferentes concentrações de DNA, para a reação da PCR, uma com 5µL do DNA original e outra com 60 ng /reação. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese (80 V por 1 ½ horas) em gel de agarose 1,5%, utilizando o tampão de corrida 1 x TBE (Tris-borato-EDTA). Um marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen™) foi utilizado como padrão de massa molecular co-migrante. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), fotografados e analisados sobre luz UV (Vilber Lourmat – Photodocumentation System, Model: DP-001.FDC).

### **3.5. ELISA**

A sorologia para detecção de anticorpos foi realizada utilizando o teste ELISA indireto no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), através de kit produzido pela própria empresa.

Este teste foi produzido a partir de antígeno protéico extraído com Tween 20 e detecta IgG no soro suíno. A curva padrão de soros controles (4 pontos) foi obtida pela repetição das leituras em dias diferentes. O controle intra-teste foi feito pelo coeficiente de variação entre as réplicas de soro testadas e pelo coeficiente de correlação entre a curva padrão e a leitura dos controles do dia. Os resultados do teste foram corrigidos por regressão linear comparando a curva padrão dos controles e a curva obtida no dia do teste. O ponto de corte foi calculado pela análise de dispersão de uma população comprovadamente negativa através da mediana da densidade ótica mais quatro desvios padrões (comunicação pessoal por Dra. Jalusa Deon Kich).

### 3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os fragmentos de pulmão foram processados e emblocados no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” e enviados ao Laboratório de Patologia da EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC) para a realização do teste imuno-histoquímico.

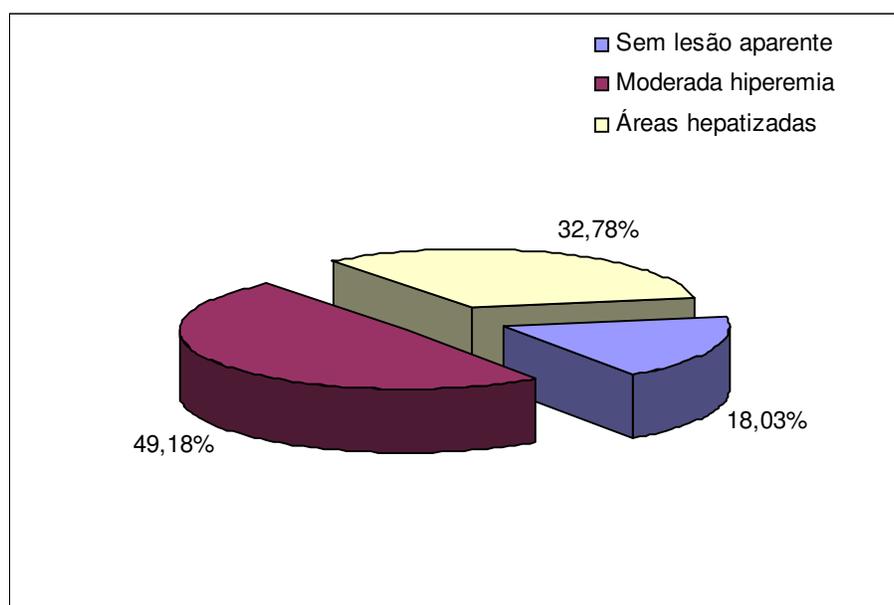
O teste imuno-histoquímico foi processado segundo a técnica de Avidina-Biotina-Peroxidase (Vectasin ABC kit anti-rabbit). A recuperação antigênica foi realizado através do método de microondas e com solução de pepsina. Como anticorpo primário foi utilizado soro policlonal anti-*Mycoplasma hyopneumoniae*, produzido em coelho, incubado por 90 minutos. A complementação da reação foi realizada com soros do kit ABC- Rabbit conforme recomendação do fabricante. As lavagens entre cada reação foram realizadas por 5 minutos em PBS pH 7,4 com 0,05% de Tween 20. A revelação da reação foi efetuada com AEC e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer. Os resultados foram interpretados de acordo com a quantidade de antígeno marcada na lâmina, conforme descrição a seguir (comunicação pessoal por Dr. Nelson Morés):

- (+) discreta/fracamente positiva;
- (++) moderadamente positiva;
- (+++) acentuada/fortemente positiva

## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DA MACROSCOPIA

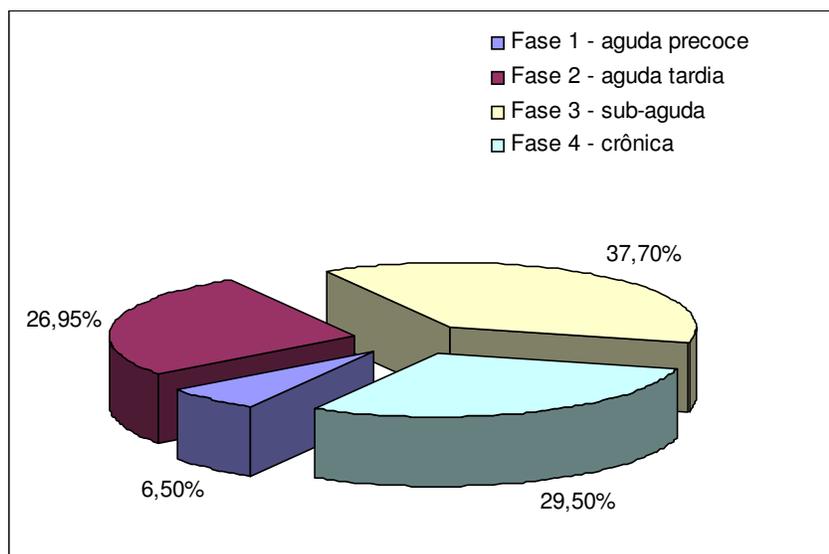
Da análise anatomopatológica dos 61 fragmentos de pulmões provenientes de suínos em fase de terminação, 11 amostras (18,03%) não apresentaram lesão aparente sugestivas de Pneumonia Enzoótica Suína ao exame macroscópico, 30 amostras (49,18%) exibiram alterações circulatórias caracterizadas por moderada hiperemia focal, 20 amostras (32,78%) mostraram alterações circulatórias caracterizadas pela presença de áreas avermelhadas nas regiões antero ventrais, áreas hepatizadas e de coloração púrpura ao cinza localizadas nas porções dos lobos apicais. Estas áreas eram bem definidas, com nítida delimitação com o parênquima pulmonar (Figura 1 e Tabela 1).



**Figura 1.** Porcentagem de lesões sugestivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, em exame macroscópico, para amostras de pulmão de 61 suínos em fase de terminação.

## 4.2. HISTOPATOLÓGICO

O exame histopatológico revelou diferentes características histológicas das lesões (Figura 2). Das 61 amostras de fragmentos de pulmão provenientes de suínos em fase de terminação, quatro amostras (6,5%) mostraram áreas de parênquima pulmonar sem alterações (Figura 3), bronquíolo sem alteração (Figura 8), exsudato inflamatório alveolar com edema, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (Figuras 5 e 6); 16 amostras (26,95%) mostraram bronquíolo e brônquio com espessamento da lâmina própria (Figuras 9 e 10), brônquio com espessamento e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria (Figuras 11 e 12); 23 amostras (37,70%) exibiam infiltrado linfoplasmocitário perivascular moderado (Figura 13) e severo (Figura 14), infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar e perivascular (Figura 15), infiltrado peribronquiolar discreto (Figura 16) e severo (Figura 17); 18 amostras (29,50%) apresentaram atelectasia alveolar (Figura 4), hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolos discreta (Figura 18), moderada (Figura 19) e severa (Figuras 7 e 21), hiperplasia de tecido linfóide associado a brônquio (Figura 20).



**Figura. 2.** Porcentagem de lesões sugestivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, em exame histopatológico, para amostras de pulmão de 61 suínos em fase de terminação.

Todas as 61 amostras apresentaram lesões no exame histopatológico, sendo que três dessas amostras foram negativas na PCR e foram classificadas nas fases 1 e 2. Nas 58 amostras restantes com resultado positivo na PCR, o grau de lesão variou entre fase 1 e 4, com maior frequência das amostras (37,7%) na fase 3.

#### **4.3. OPTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Os protocolos de extração do DNA utilizados neste estudo, método clássico fenol-clorofórmio-etanol com modificações, para as amostras de tecidos de pulmão, e o método “choque térmico” para o controle positivo (cultura) foram eficientes na extração do DNA. As concentrações e qualidade do DNA extraído por meio do método clássico fenol-clorofórmio-etanol modificado para as amostras de tecidos podem ser observadas através dos dados apresentados no Anexo V.

Observou-se que 39,3%, 31,2%, 13% e 4,9% das amostras apresentaram concentrações de DNA entre 10 e 200µg/mL, 201 e 400 µg/mL, 401 e 600 µg/mL e 801 e 1000 µg/mL, respectivamente, enquanto que 11,6% das amostras apresentaram concentrações que variaram entre 1001 e 3625 µg/mL. A relação de absorvância 260/280nm em 62,29% das amostras foi entre 1.700 e 2.500. Para a controle positivo (cultura) a concentração de DNA foi de 1485 µg/mL com a relação de absorvância 260/280nm de 1062.

Após o teste em sistema de gradiente utilizando uma amplitude térmica de 2°C acima e abaixo da temperatura média de 56°C na hibridização, foi estabelecida a temperatura ótima de hibridização para 56°C PCR e para 58°C NPCR, uma vez que nestas temperaturas as amplificações foram satisfatórias e sem a presença de produtos inespecíficos. Entre as diferentes concentrações MgCl<sub>2</sub> testadas [1,25mM; 1,5mM e 1,75mM] foi estabelecida a concentração de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> tanto para PCR quanto para N-PCR, por resultar em produtos satisfatórios nas reações de amplificação. Para a reação da PCR foi adicionada uma solução contendo 5µL da amostra de DNA independente da concentração original e 45 µL de PCR-mix contendo uma (1) unidade de Taq DNA polimerase, 1x PCR buffer (20mM Tris HCl pH 8,4 e 50mM KCl), 0,66mM de dNTPs, 0,5µM do primers externos e internos. Na

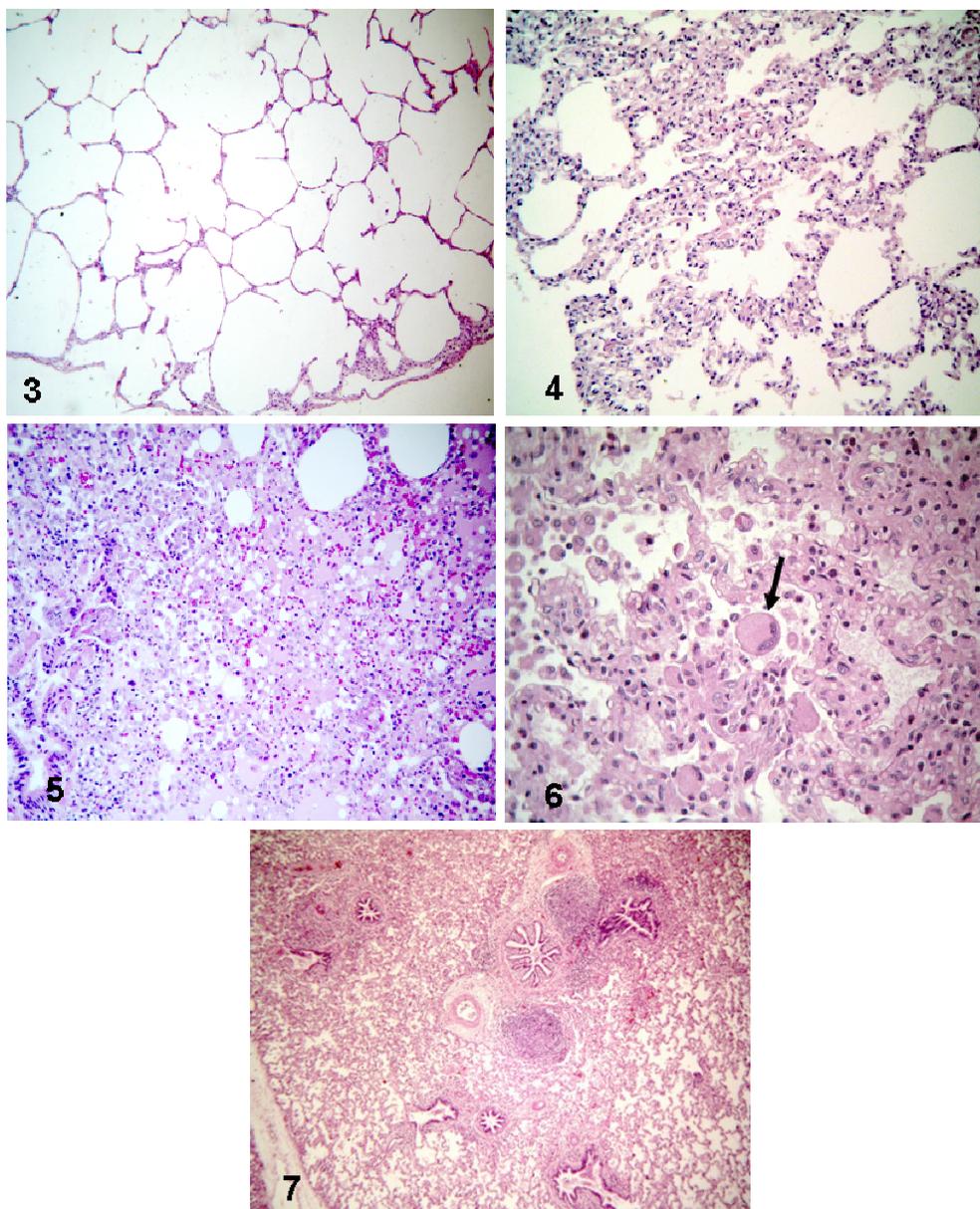
reação da N-PCR a quantidade do produto da primeira amplificação utilizada foi de 2 $\mu$ L e 48 $\mu$ L de N-PCR mix.

Foram testadas três amostras padrão de *M. hyopneumoniae* e 10 amostras clínicas na concentração final da reação de 60ng. Os resultados revelaram que 3 amostras clínicas (Figura 29, colunas 4, 5 e 8), que foram positivas quando utilizados 5 $\mu$ L do DNA original (Figura 28 colunas 10, 11 e 12), não produziram o fragmento correspondente a 352pb, utilizando 60ng por reação.

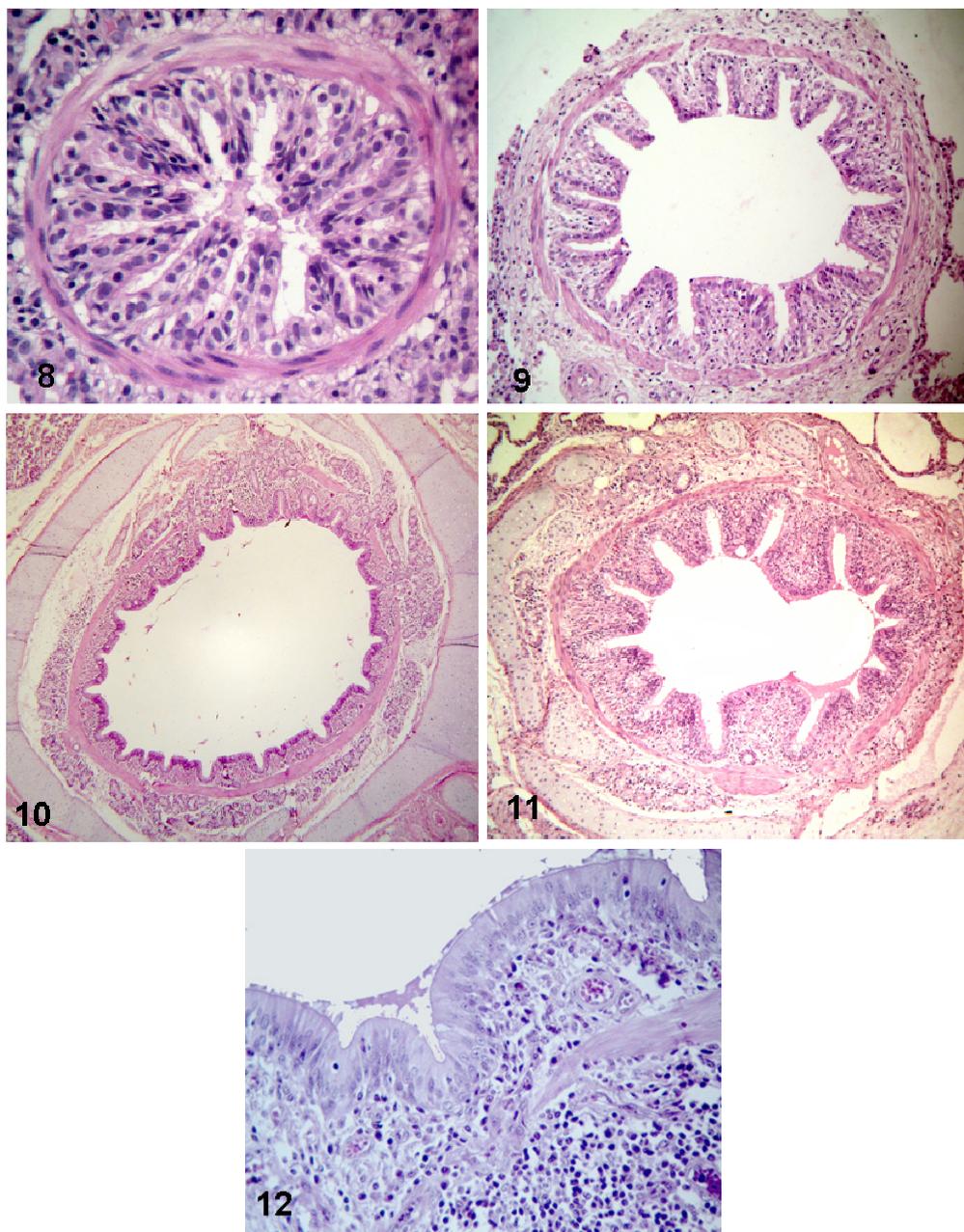
Diante dos resultados foi padronizado, o protocolo de reação, usando 5 $\mu$ L do DNA original.

As amplificações foram realizadas utilizando-se os seguintes programas de amplificação: (PCR) - desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, hibridização a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção em refrigeração 4°C; (Nested-PCR) – utilizou-se o mesmo programa de amplificação alterando-se a temperatura de hibridização para 58°C por 1 minuto.

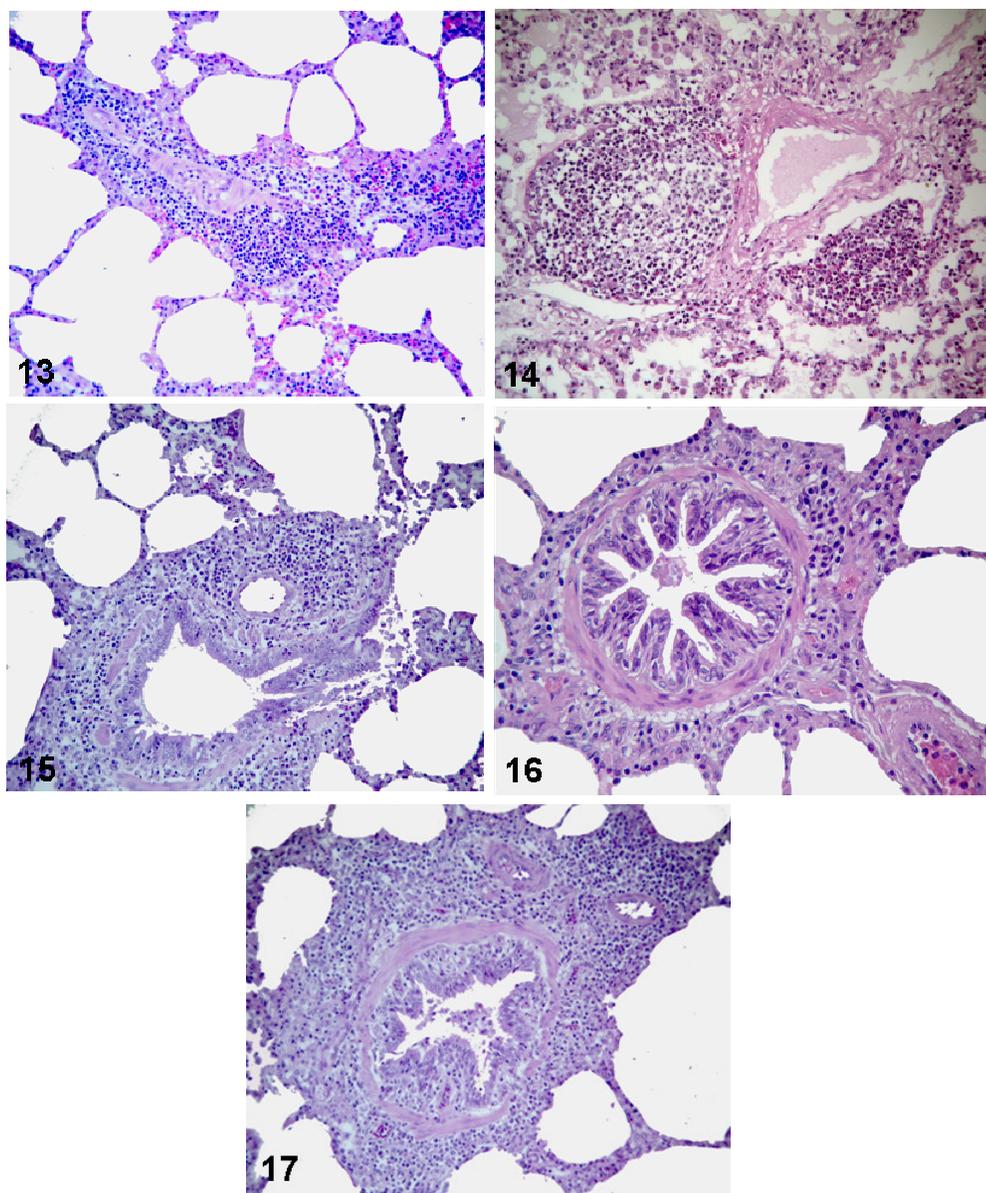
Os padrões dos fragmentos amplificados estão representados nas Figuras 22 a 29.



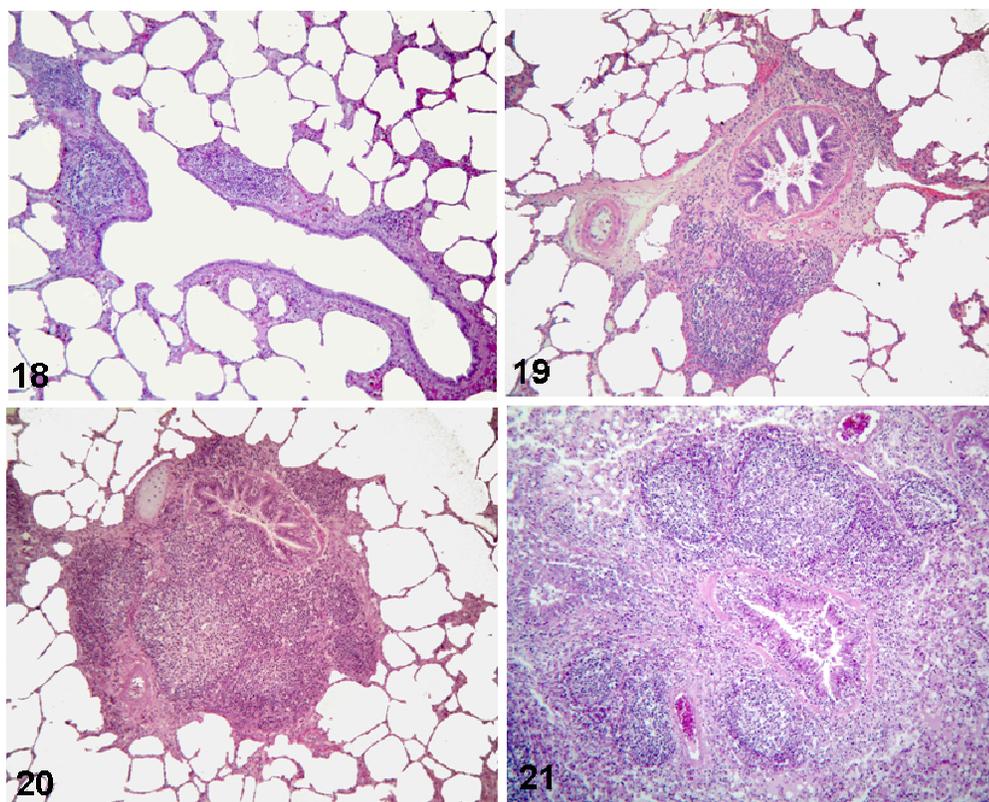
**Figuras 3 - 7.** Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 3, Parênquima pulmonar sem alterações [x 20]; 4, Atelectasia alveolar [x 20]; 5, Exsudato inflamatório alveolar, com edema, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas [x 10]; 6, Detalhe do exsudato inflamatório alveolar, (seta) célula gigante multinucleada [x 10]; 7, Visão panorâmica, Pneumonia Enzoótica Suína [x 10].



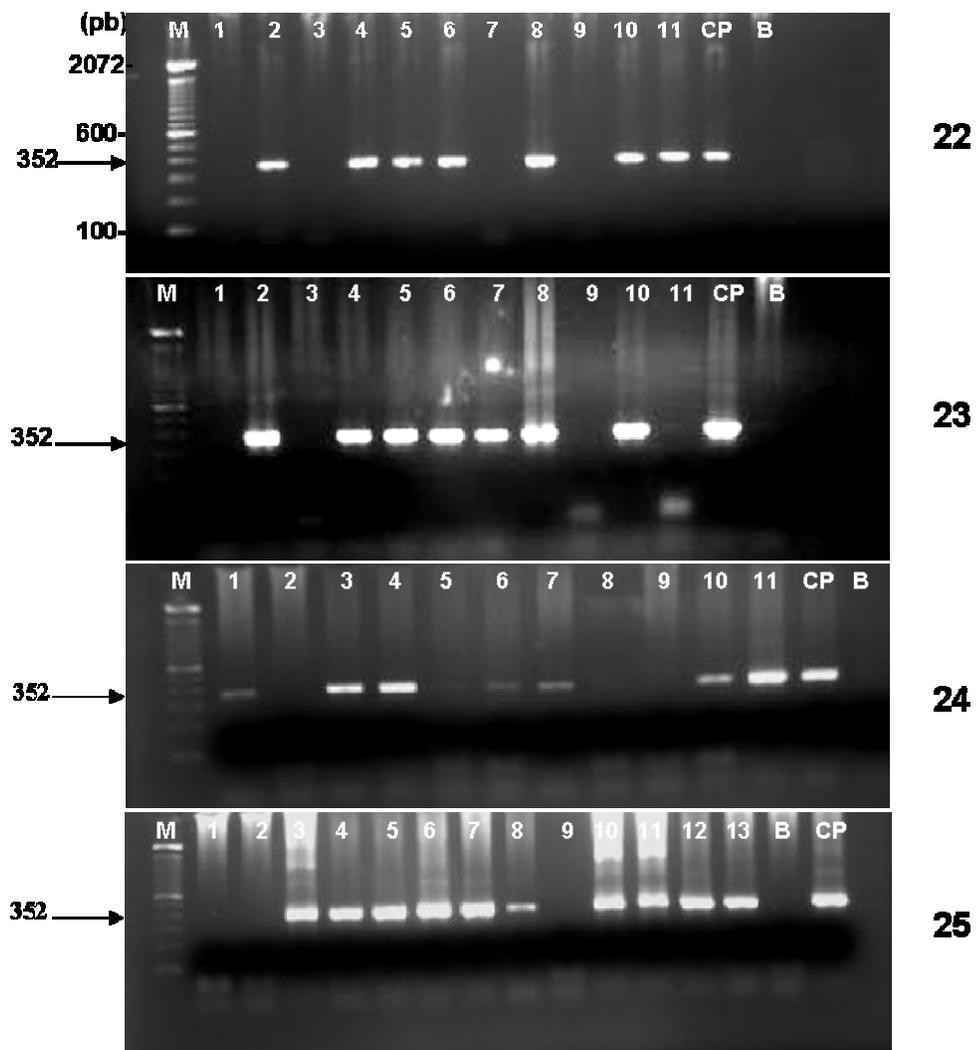
**Figuras 8 - 12.** Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 8, Bronquíolo sem alteração [x 40]; 9, Bronquíolo, espessamento da lâmina própria [x 20]; 10, Brônquio, espessamento da lâmina própria [x 20]; 11, Brônquio, espessamento e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria [x 5]; 12, Detalhe do brônquio com espessamento e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria [x 40].



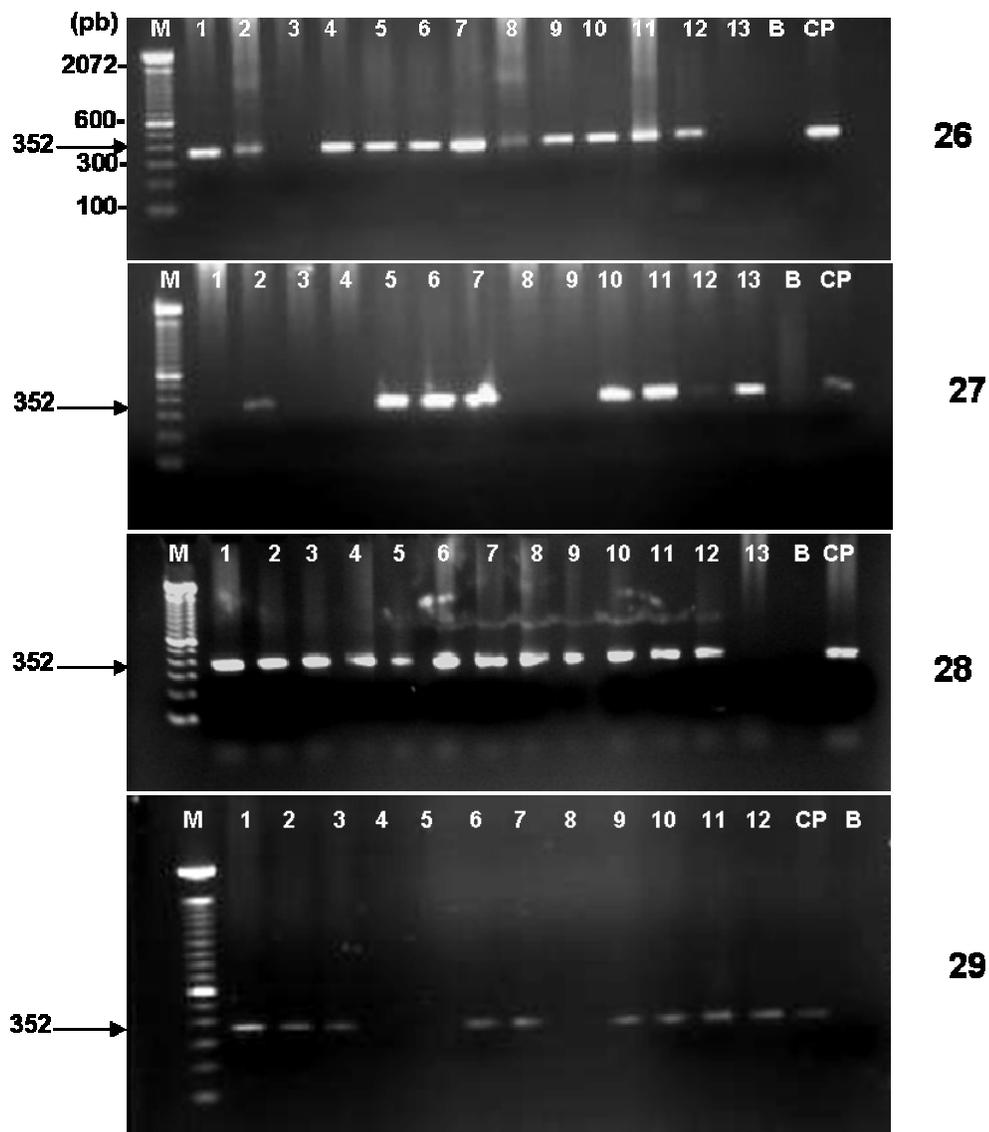
**Figuras 13 - 17.** Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 13, Infiltrado linfoplasmocitário perivascular moderado [x 20]; 14, Infiltrado linfoplasmocitário perivascular severo [x 20]; 15, Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar e perivascular [x 20]; 16 Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar discreto [x 40]; 17, Infiltrado linfoplasmocitário peribronquiolar severo [x 20].



**Figuras 18 - 21.** Pulmão suíno. Técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 18, Hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolo discreta [x 10]; 19, Hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolo moderada [x 10]; 20, Hiperplasia de tecido linfóide associado a brônquio severa [x 10]; 21, Hiperplasia do tecido linfóide associados a bronquíolos severa [x 10].



**Figura 22 – 25.** Produto amplificado por PCR em amostras clínicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* [1 - 13]. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de massa molecular (100pb DNA Ladder- InvitrogenTM); B: Branco; CP: Controle positivo (EMBRAPA).



**Figura 26 - 29.** Produto amplificado por PCR em amostras clínicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* [1 - 13]. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de massa molecular (100pb DNA Ladder- InvitrogenTM); B: Branco; CP: Controle positivo (EMBRAPA).

#### 4.4. ELISA E PCR

Os resultados individuais comparativos para ELISA, PCR, microscopia e macroscopia dos 61 suínos são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados individuais comparativos de diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* por ELISA indireto, PCR, microscopia e macroscopia do pulmão de 61 suínos ao abate.

Tatuagem	ELISA	PCR	Microscopia	Macroscopia
A01	+	+	4	+
A02	+	+	2	-
A03	+	+	2	+
A04	-	+	3	-
A05	+	+	3	+
A06	+	+	4	-
A07	-	+	2	+
A08	+	+	3	+
A09	+	+	3	+
A10	+	+	2	+
A11	+	+	2	-
A13	-	+	3	-
A14	+	+	3	+
A15	+	+	3	+
A16	+	+	3	-
A17	+	+	3	+
AR1	-	+	2	-
AR3	-	-	2	+
AR4	-	-	1	+
AR5	-	+	1	+
AR6	+	+	4	+
AR7	-	+	4	+
AR9	+	+	4	+
AR10	+	+	3	+
AE2	+	+	3	+
AE3	+	+	3	+
AE4	+	+	3	+
AE5	+	+	3	+
AE6	+	+	3	+
BE4	+	+	2	+
BB8	+	+	3	+
BE7	+	+	4	+
BF5	+	+	4	-
BE6	+	+	3	-
BE9	+	+	3	+
BB3	-	+	3	+
BB5	-	+	3	+
BB6	-	+	2	-
BF3	+	+	2	+
BB2	+	+	4	+

Continua ...

Continuação ...

Tatuagem	ELISA	PCR	Microscopia	Macroscopia
BF4	+	+	4	+
BB1	+	+	1	+
BF6	+	+	4	+
BE5	+	+	4	+
BE2	+	+	4	+
BE1	+	+	3	+
BB9	+	+	3	+
BF1	+	+	4	+
BE8	+	+	2	+
CF1	+	+	4	+
CF2	+	+	4	+
CE1	-	+	4	+
CE3	+	+	2	+
CE4	+	+	2	+
CE5	+	+	4	+
CE6	+	+	2	+
CR3	-	+	2	+
CR6	+	+	3	+
CR7	+	+	1	+
CR8	-	+	4	+
CR9	+	-	2	-

Micro = microscopia (histopatológico). Resultados: 0 (sem lesão); 1 (aguda precoce);

2 (aguda tardia); 3 (subaguda); 4 (crônica). Macro = macroscopia.

Resultados: - (sem lesão); + (com lesão).

#### 4.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todas as 13 amostras com resultados negativos para ELISA, e ainda uma amostra sabidamente negativa para ambos ELISA e PCR, foram submetidas para exame por imuno-histoquímica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultado de amostras de pulmão proveniente de suínos ao abate testadas na Imuno-histoquímica (IHQ) para *Mycoplasma hyopneumoniae*.

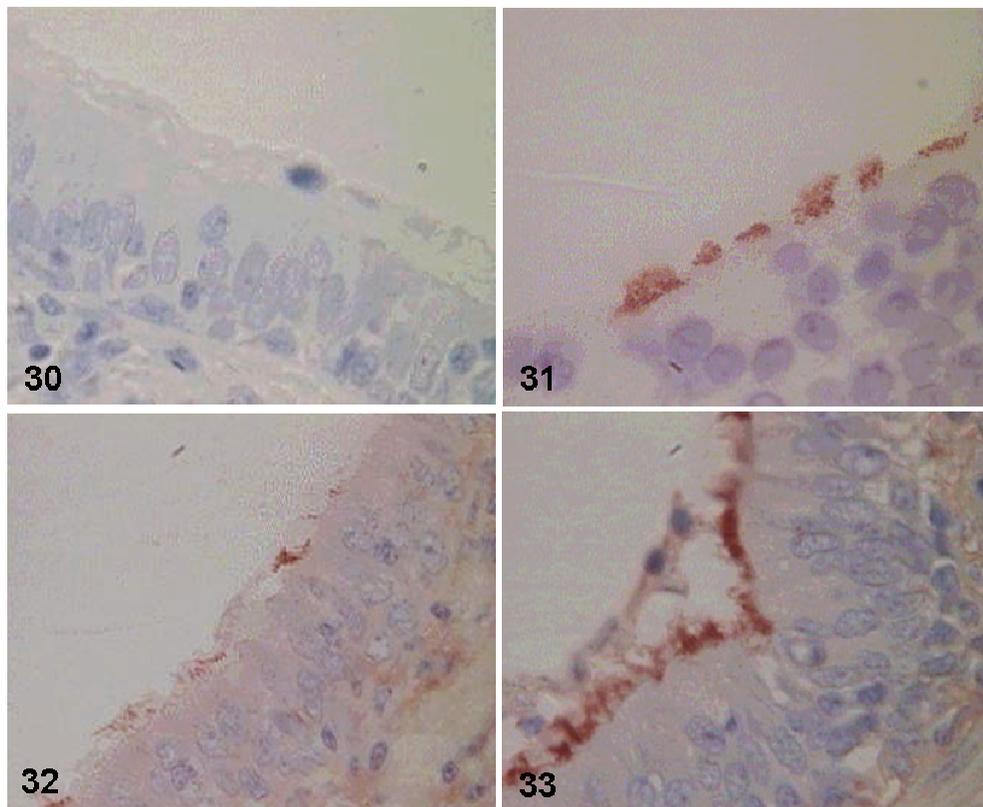
Tatuagem	IHQ	ELISA	PCR	Microscopia	Macroscopia
A04	Positivo: ++	-	+	3	-
A07	Negativo	-	+	2	+
A13	Negativo	-	+	3	-
AR1	Negativo	-	+	2	-
AR4	Negativo	-	-	1	+
AR5	Negativo	-	+	1	+
AR7	Positivo: +++	-	+	4	+
BB3	Positivo: +	-	+	3	+
BB5	Negativo	-	+	3	+
BB6	Negativo	-	+	2	-
CE1	Positivo: +++	-	+	4	+
CR3	Negativo	-	+	2	+
CR8	Negativo	-	+	4	+
CR9	Negativo	+	-	2	-

IHQ = imuno-histoquímica: (+) discreta/fracamente positiva; (++) moderadamente positiva; (+++) acentuada/fortemente positiva. Microscopia (histopatológico): 0 (sem lesão); 1 (aguda precoce); 2 (aguda tardia); 3 (subaguda); 4 (crônica). Macroscopia: - (sem lesão); + (com lesão).

O teste de imuno-histoquímica dos pulmões revelou áreas de imunomarcção com diferentes graus de intensidade, mais evidentes nas áreas de maior lesão (Figuras 30, 31, 32 e 33).

Em algumas amostras foi detectada presença de pigmentos fórmicos, nos brônquios e bronquíolos, o que prejudicou o exame.

Uma amostra apresentou resultado negativo no PCR e no exame imuno-histoquímico, no exame histopatológico mostrou moderada hiperplasia de tecido linfóide associado a bronquíolo (Figura 19), sendo, porém reagente no teste de ELISA.



**Figuras 30- 33.** Pulmão suíno. Técnica de coloração imuno-histoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae*. 30, Controle negativo; 31, Controle positivo; 32, Reação fracamente positiva; 33, Reação fortemente positiva [x 100]. (Fotografias cedidas pela EMBRAPA Suínos e Aves/Concórdia).

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados diversos métodos de diagnóstico para o *Mycoplasma hyopneumoniae* buscando compará-los entre si. Os métodos diagnósticos incluíram o exame macroscópico, o exame histopatológico, o ELISA, a PCR e o exame imuno-histoquímico.

A técnica do ELISA foi escolhida por ser atualmente a mais comum e freqüentemente utilizada para avaliar o status do rebanho suíno (CALSAMIGLIA *et al.*, 2000). A técnica da PCR foi escolhida como padrão para o estudo comparativo, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, tornando a identificação do agente mais precisa (MATTSSON *et al.*, 1995; BACCARO *et al.*, 1999; VERDIN *et al.*, 2000). E as técnicas de macro e microscopia foram utilizadas por serem as mais tradicionais no diagnóstico da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA *et al.*, 2000).

À análise anatomopatológica do presente estudo, 11 amostras (18,03%) não apresentaram lesões sugestivas de PSE, 30 amostras (49,18%) exibiram alterações circulatórias e 20 amostras (32,78%) apresentaram lesões características de pneumonia. Em estudo semelhante realizado com suínos provenientes de granjas sabidamente positivas, 16 (40,0%) não mostraram lesões aparentes à macroscopia, 5 (12,5%) exibiram alterações circulatórias e 19 (47,5%) apresentaram lesões características de pneumonia (RIBEIRO *et al.*, 2004). Deste modo, sabendo que no presente estudo os animais foram em sua maioria positivos para a PES, estes apresentaram um menor índice de ausência de lesões e um maior índice de lesões características de pneumonia.

A avaliação macroscópica mostrou-se pouco sensível para detectar a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) no presente estudo. Do total de amostras, 11 destas amostras não apresentaram lesões macroscópicas embora o resultado na PCR tenha sido positivo. Além disso, duas amostras com resultado negativo na PCR exibiram lesões pulmonares. Embora lesões macroscópicas sejam sugestivas de PES, elas não são patognomônicas uma vez que outros organismos, como o vírus da Influenza Suína, podem produzir lesões similares (ROSS, 1999; DONE *et al.*, 1991; THACKER *et al.*, 2001). Também, FUENTES e PIJOAN (1987) foram capazes de induzir lesões indistinguíveis daquelas causadas por *M. hyopneumoniae* por co-

infecção em suínos com o vírus da Pseudo-raiva e a *Pasteurella multocida*, como observado em uma das amostras que apresentou lesão microscópica fase 1, sendo inespecífica, pois apresentou resultado negativo nas demais técnicas. Além disso, lesões em resolução podem ser confundidas com lesões recentes de infecção por *M. hyopneumoniae*, na linha de abate (LIVINGSTON *et al.*, 1972; SORENSEN *et al.*, 1997).

Embora a presença de lesões histológicas sugestivas de *M. hyopneumoniae* seja considerada como diagnóstico da infecção, a detecção do patógeno em animais sem lesão, como observado no presente estudo, já havia sido descrita (SORESNSEN *et al.*, 1997). Entretanto, o diagnóstico baseado somente no exame histopatológico pode também conduzir a erros nos casos de animais com lesões em estágios iniciais, ou ainda no estágio de resolução da doença (CALSAMIGLIA *et al.*, 2000). Assim sendo, embora todas as amostras do presente estudo tenham apresentado lesões sugestivas no exame histopatológico, três (4,9%) dessas amostras foram negativas na PCR, sugerindo outro agente etiológico; mesmo porque as lesões observadas nestas três amostras foram de fase inicial 1 e 2.

A alta concordância observada no presente estudo entre a microscopia e a PCR pode ter sido conseqüência da alta prevalência da doença nos animais testados; desta forma, estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar esta diferença em rebanhos com menor prevalência de PES, para se verificar se há mesmo esta relação nestas condições (CALSAMIGLIA *et al.*, 2000).

A técnica de ELISA é considerada um método de custo baixo e rápido, adequado para triagem de um grande volume de amostras, ou seja, detecta indiretamente a circulação do antígeno e direciona a coleta de amostras para diagnósticos confirmatórios. A partir da detecção de anticorpos poderão ser utilizados métodos diagnósticos para detecção de antígeno, como por exemplo, a PCR ou ainda Nested-PCR o que aumenta a especificidade do teste (CALSAMIGLIA *et al.*, 1999). A sensibilidade e especificidade de diferentes testes de ELISA disponíveis foram comparados em vários estudos, e possuem alta variação da técnica (LE POTIER *et al.*, 1994; LEVONEN *et al.*, 1999; ERLANDSON *et al.*, 2002, CHITTICK *et al.*, 2000; STRAIT *et al.*, 2004). O presente estudo mostrou uma concordância de 46 amostras (78,7%) entre o ELISA e a PCR, e estes resultados

confirmam que o teste de ELISA possui boa sensibilidade e pode ser útil na triagem diagnóstica do rebanho suíno.

A infecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* parece ficar restrita as vias aéreas inferiores aos seis meses de idade dos suínos, como já demonstrado experimentalmente em estudo utilizando o swab diagnóstico (VERDIN *et al.*, 2000). Como mostrado em nosso estudo, os animais foram também altamente positivos (95,1%) na detecção do agente no pulmão pela PCR, o que sugere que o *Mycoplasma hyopneumoniae* também se comporte deste modo em animais de produção. O ELISA dos mesmos suínos foi também alto (77,0%), mostrando que, neste período de vida, os animais em rebanhos contaminados provavelmente já foram expostos cronicamente.

Embora o ELISA e a PCR tenham tido um alto grau de concordância (78,7%), o percentual de resultados positivos na PCR foi superior ao de positivos no ELISA (95,1 e 77,0%, respectivamente). Outro fato interessante foi que as quatro amostras positivas no diagnóstico imuno-histoquímico foram todas positivas na PCR e não reagentes no ELISA.

No presente estudo foi modificada a temperatura de hibridização durante a otimização da técnica da PCR. A temperatura de hibridização nas duas PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae* encontradas na literatura variou de 60 e 59,5 °C, e 65,5 e 59,5 °C, respectivamente (YAMAGUTI *et al.*, 2003, YAMAGUTI, 2003). No presente estudo, as temperaturas de hibridização de 56 e 58 °C foram respectivamente as que melhor produziram amplicons nas condições do Centro Diagnóstico “Marcos Enrietti” (CDME).

Também a concentração de Cloreto de Magnésio foi modificada destes trabalhos, para 2,0 mM e 2,5 mM nas duas PCR, respectivamente (YAMAGUTI *et al.*, 2003, YAMAGUTI, 2003). No presente estudo utilizou-se um padrão de 1,5 mM nas duas PCR, pois foi a concentração ideal para a reação da PCR no CDME.

No presente estudo, optou-se pela técnica do Nested-PCR por ser uma técnica promissora no diagnóstico do *M. hyopneumoniae*, por ser mais específica e sensível que a PCR simples (YAMAGUTI *et al.*, 2003). Além disso, a utilização da Nested-PCR tem possibilitado detectar *M. hyopneumoniae* mesmo quando em baixos níveis de contaminação (CALSAMIGLIA *et al.*, 1999).

Nove amostras apresentaram simultaneamente resultados negativos no teste imuno-histoquímico, mas positivos na PCR do *Mycoplasma hyopneumoniae*. Segundo DOSTER & LIN (1988), animais cronicamente afetados podem exibir pequena concentração de microrganismos, o que poderia justificar a ausência da imunomarcção em algumas amostras de pulmão no presente estudo. Além disso, o uso de formol não tamponado permitiu o aparecimento de pigmentos fórmicos prejudicando a leitura do exame. A conservação do material também interferiu na avaliação devido à necessidade de imersão completa do pulmão no líquido fixador, para minimizar as alterações “post mortem”. (MORES; EMBRAPA, comunicação pessoal).

As quatro amostras positivas mostraram diferentes graus de intensidade na imuno-histoquímica, sendo mais evidentes nas áreas de maior lesão, de forma similar ao relatados por outros autores (RODRIGUEZ *et al.*, 1996). Os locais de imunomarcção foram mais intensos nas áreas de maior concentração do antígeno, correspondendo aos locais de lesões mais desenvolvidas (BASHIRUDDIN *et al.*, 1999). Segundo BRUGGMAN e ENBERG (1977) o padrão de coloração pode estar presente em forma de colônias ou ainda distribuído ao acaso na superfície de células epiteliais, o que dá um aspecto irregular ao precipitado, contribuindo desta maneira para a avaliação dos resultados desta reação ( LUTSKY *et al.* 1986).

Uma das amostras (CR9) foi reagente no teste de ELISA, mas negativa na imuno-histoquímica. Além disso, sua macroscopia não apresentou lesões e na microscopia foi classificada como fase 2. Sendo assim, pode ser considerada como lesão crônica em outro local do pulmão, ou ainda um resultado falso positivo porque também a PCR apresentou resultados negativos. Isto corrobora com os achados de BEREITER *et al.*, (1990) que observou reação cruzada com outros micoplasmas, mostrando a baixa especificidade do teste de ELISA indireto. Assim sendo, a subjetividade do método macroscópico, a regressão das lesões e a não especificidade das mesmas contribuem para que um diagnóstico baseado apenas na macroscopia seja de pouco valor como indicador da PES (ARMSTRONG *et al.*, 1994).

## 6. CONCLUSÕES

Baseado no presente estudo conclui-se que:

1. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostrou-se eficaz na detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras pulmonares de suínos em fase de terminação ao abate, no entanto deve ser otimizada para cada laboratório devido às características particulares de cada um;
2. O diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela conjunção dos sinais clínicos e dos aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões; entretanto, esse procedimento possui uma parcela de subjetividade e de imprecisão, sendo em alguns casos, necessário exames complementares para a confirmação do diagnóstico como mostrou a PCR no presente estudo;
3. A PCR mostrou-se segura para a detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras pulmonares de suínos em fase de terminação ao abate, pois apresentou melhores resultados no diagnóstico que o ELISA quando comparados com a técnica imuno-histoquímica;
4. O teste de ELISA pode ser uma excelente ferramenta para triagem sorológica do *Mycoplasma hyopneumoniae*, no entanto o diagnóstico definitivo deve ser feito pelo PCR diagnóstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIVEN, P.; BLANCHARD, B.; SAILLARD, C.; KOBISCH, M.; BOVÉ, J. M. A., specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. **Molecular Cellular Probes**, 6: 423-429, 1992.

AHRENS, P. & FRIIS, N. F. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with DNA probe. **Letter Application Microbiology**, 12: 249-253, 1991.

ANDREASEN M.; MOUSING J.; KROGSGAARD THOMSEN L.: No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. **Pre. Vet. Med.**, 52: 147-161, 2001.

ARMSTRONG, C.H. Porcine Mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Eds.). **Mycoplasmosis in animals**: Laboratory diagnosis. Ames: Iowa State University, 1994.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* através da PCR em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte, p.163-164, 1999.

BAKERSVILLE, A. Development of the Early lesions in Experimental Enzootic Pneumonia of Pigs: An ultrastructural and histological study. **Res. Vet. Sci.**, 13: 570-578, 1981.

BASHIRUDDIN, J.B.; SANTINI, F.G.; DE SANTIS, P. et al. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* in tissue from an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polimerase chain reaction. **Vet. Rec.**, 145: 271-274, 1999.

BEREITER, M. YOUNG T. F.; JOO, H.S.; ROSS, R.F: Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay

for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. **Vet. Microbiol**, 25: 177-192, 1990.

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

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa DAS nº 19** de 15 de janeiro 2002.

BRUGGMANN, S.; ENBERG, B. Demonstration of *M. hyopneumoniae* in pig lungs by the enzyme-linked immunoperoxidase technique. **Vet. Rec.**, 101: 137, 1977.

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**, 11: 246-251, 1999.

CALSAMIGLIA, M.; COLLINS, J.E.; PIJOAN, C. Correlacion between the presence of enzootic pneumoniae lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. **Vet. Microbiol**. 76: 299-303, 2000.

CARLTON, W. W.; McGRAVIN. **Patologia Veterinária Especial de Thompson**. 2ªed. p.173, 1998.

CHEN, J.R.; LIAO, C.W.; MAO, C.N.W. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with Pseudomonas exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, 80: 347-357, 2001.

CHITTICK, W.; A novel approach for reporting of serologic antibody results using a competitive *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA. In: **Proceedings of the 16<sup>th</sup> IPVS Congress** Melbourne Australia. p.456, 2000.

CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TORTORA, J.; COLMENARES, G.; LOPEZ-REVILLA, R. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 52: p.434-438, 1988.

CONCEIÇÃO, F.R.; TURNES, G.C. *Moraxella bovis*: Influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. **Ciência Rural**, 33:778-787, 2003.

CONCEIÇÃO, F.R.; PAOLICCHI, F.; COBO, A. L.; GIL-TURNES, C. Antigenic relationships of *Moraxella bovis* strains recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentine, Brazil and Uruguay between 1983 and 2000. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 67:315-318, 2003.

CRISTENSEN, G., SORENSEN, V., MOUSING J.: Disease of the Respiratory System, In **Diseases of Swine**, 8<sup>th</sup> Ed. Eds. Straw BE, D'ALLAIRE S, MENGELING WL, TAYLOR DJ. Iowa State University Press, Ames. p. 913-941, 1999.

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

DESROSIERS, R. A. Review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Journal of Swine Health and Production**, 9:233-237, 2001.

DJORDJEVIC, S.P; CORDWELL, S. J; DJORDJEVIC, M. A.; WILTON, J. & MINION, F.C. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. **Infection and Immunity**, 72:2791-2802, 2004.

DONE, SH., Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. **Vet. Rec.**, 22: 582-586, 1991.

DONE, S.H.: Enzootic pneumonia (Mycoplasmosis) revisited. **Pig J.**, .38:40-61, 1996.

DOSTER, A. R.; LIN, B.C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. **Am. J. Vet. Res.**, 49: 1719-21, 1988.

ERLANDSON, K.; THACKER, B.; WEGNER, M.; EVANS, R.; THACKER, E. Evolution of three antibody ELISA test for *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: **Proceedings of the 17<sup>th</sup> IPVS Congress**. Ames, Iowa. p.74, 2002.

FAGAN, P.K.; DJORDJEVIC, S.P.; EAMENS, G.J.; CHIN, J. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection and Immunity**, 65:2502-2507, 1997.

FALK K.; LIUM B.M.: An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in Slaughter weight swine from nine selected herds. **Acta. Vet. Scand.**, 32: 79-88, 1991.

FEENSTRA, A. A.; SORENSEN, V.; FRIIS, N. F.; JENSEN, N. E.; BILLE-HANSEN, V. Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In: Proceedings Of The International Pig Veterinary Society Congress, 13, 1994, Bangkok, Thailand. **Anais**. Edited by Prachak Poomvises & Pringsri Ingkaninum, p.26-30. 1994

FRIIS, N.F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. **Nord Veterinary Medicine**, 27:337-339, 1975.

FUENTES, M.; PIJOAN, C. Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with Pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. **Am J. Vet. Res.**,48: 1446-1448, 1987.

FUTO, S.; SETO, Y.; MITSUSE, S; MORI, Y. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by using rRNA – oligodeoxynucleotide hybridization. **Journal of Clinical. Microbiology**, 30: 1509-1513, 1992.

HSU, T.; MINION, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**, 66:4762-4766, 1998.

HURNIK, D.; HANNA, P.E.; DOHOO, I.R. Evaluation of rapid gross visual appraisal of swine lungs at slaughter as a diagnostic screen for enzootic pneumonia. **Can. J. Vet. Res.**, 57:37-41, 1993.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2005. Capturado em 10 fev. 2005. On line. Disponível na Internet <http://www.ibge.gov.br/>

KOBISCH, M. Mycoplasma diseases in pigs – Old diseases still causing trouble. In: THE 16<sup>TH</sup> INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne, Austrália, **Anais**,. Melbourne, p.434-438, 2000.

KOBISCH, M. & FRIIS, N. F. Swine mycoplasmoses. **Rev..Sci..Tech..Off.int.Epiz.**, v. 15: 1569-1605, 1996.

KOBISCH, M.; BLANCHARD, B.; LE POTIER M.F.: Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: Duration of the disease and resistance to reinfection. **Vet. Res.** 24: 67-77, 1993.

KUNDSIN, R. B. Characterization of Mycoplasma aerosols as to viability, particle size and lethality of ultraviolet irradiation. **Journal of Bacteriology**, 91:942-944, 1965.

LEON E. A.; MADEC, F.; TAYLOR N.M.; KOBISCH M: Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from to finish farms, **Vet. Microbiol.**, 78: 331-341, 2001.

LE POTIER, M .F; ABIVEN, P.; KOBISCH, M. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Res. Vet. Sci.**, 56:.338-345, 1994.

LEVONEN, K.; SIHVO, E.; VEIJALAINEN, P. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* and correlation with herd status. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 11: 547-549, 1999.

LIVINGSTON CW, STAIR EL, Underdahl MS Mebus CA: 1972, Pathogenesis of *Mycoplasma Pneumoniae* in Swine. **Am. J. Vet. Res.**, 33: 2249-2258, 1972.

LUTSKY, I.; LYVNI, N.; MOR, N. Retrospective confirmation of mycoplasma infection by the immunoperoxidase technique. **Pathology**,.18:.390-392, 1986.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quart**, 18:.104-109, 1996.

MANILOFF, J. Phylogeny of Mycoplasmas. In: *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.549-559, 1992.

MATTSSON, J.G., BERGSTRÖM, K.; WALLGREN, P.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Molecular Cellular Probes**, 33:.893-897, 1995.

MESSIER, S.; ROSS, R.F. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. **Am. J. Vet. Res.**, 52:1497-1502, 1991.

MIMS, C.A.; PLAYFAR, J.H.; ROIT, I.M. Estratégias para a sobrevivência dos parasitas e persistência da infecção. In: JAWETZ, E. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Manole,. p.15.1-15.12., 1995.

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

MINION, F.C.; ELLIOT, J.; LEFKOWITZ; MELLISSA, L. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, 186:7123-7133, 2004.

MORRIS C.R.; GARDNER I.A.; HIETALA S.K.; CARPENTER T.E., ANDERSON R.J.; PARKER K.M.: Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herd, 21: 323-337, 1995.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Valor Bruto da Produção Paranaense 1997 e 2004. Curitiba: **SEAB/DERAL/DEB**, 2006.

PIFFER, I. A. Pneumonia Enzoótica dos Suínos. **EMBRAPA – CNPSA**, Circular Técnica, 23p, 1983.

PRIKAZSKY, M. Endemic pneumonia in pigs and *Mycoplasma*. **Point Veterinary**, 20:137-148, 1988.

RAZIN, S. Molecular biology and of *Mycoplasmas (Mollicutes)*. **Microbiology Reviews**, 49: 419-455, 1985.

RAZIN, S.; YOGEV D; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasma*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62: 1094-1156, 1998.

RIBEIRO, F.C.; SILVA, J.C.P.; SANTOS, J.L.; PONTES, K.C.S. Diagnóstico de Pneumonia Enzoótica Suína pela técnica da imunoperoxidase. **Arq. Bras. Méd. vet. Zootec.**, 56: 709-714, 2004.

RODRÍGUEZ, J.L.; OROS, J.; RODRÍGUEZ, F. POVED, J.B.; RAMIREZ, A.; FERNANDEZ, A. Pathological e immunohistochemical study of caprine

pleuropneumonia induced by subspecies of *Mycoplasma mycoides*. **J. Comp. Pathol.**,114:373-384, 1996.

RODRÍGUEZ, F.; RAMÍREZ G.A.; SARRADELL,.; ANDRADA M.; LORENZO H.: Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, 130:306-312, 2004.

ROSS, R.F.; STEMKE, G.W. Mycoplasma infections of swine. In: TULLY, J.G. & RAZIN, S. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. New York: Academic Press,. v.2, p.275-281, 1995.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases, In: LEMAN, A. D.; STRAW, B. G.; GLOCK, R.D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. **Diseases of Swine**, 6<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Ames, IA. p. 469-483,1986.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: Straw, B.E. et al. **Diseases of Swine**. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University,. p.495-510, 1999.

SCHMIDT, J.A.; BROWNING, G.F.; MARKHAM, P.F. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 Surface Lipoprotein Is a Lipolytic Enzyme with a Preference for Shorter-Chain Fatty Acids. **Journal of Bacteriology**, 186:5790-5798, 2004.

SCHWARTZ, K. J. O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL PFIZER DE PNEUMONIA ENZOÓTICA, 1, 2001, Campinas. **Anais...**, Campinas. p.23-40, 2001.

SHELDRAKE, L. F, GARDNER, I. A.; SUNDERS, M.M.; ROMALIS, L. F. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by ELISA after experimental and natural infection of pigs. **Australian Veterinary Journal**, 67: 39-42, 1990.

SITIJAR, M.; NOYES, E.P.; SIMON, X.; PIJOAN C: Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions and production parameters in pigs. **Swine. Health. Prod.** 4: 273-277, 1996.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO. Pneumonia Enzoótica. **Clinica e Patologia Suína.** p.361, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. Pneumonia Enzoótica. **Clinica e Patologia Suína.** p. 214-218, 1994.

SORENSEN V, AHRENS P, BARFOD K, FEENSTRA AA, Feld NC, FRIIS NF, BILLE-HANSEN V, JENSEN NE, PEDERSEN MW.; *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evolution of four diagnostic assays. **Vet. Microbiol.** 54: 23-24, 1997.

STÄRK, K. D. C.; KELLER, H.; EGGENBERGER, E. Risk factors for the reinfection of SPF pig breeding herds with enzootic pneumonia. **The Veterinary Record,** 131.:532-535, 1998.

STÄRK, K. D. C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine – A literature review. **Veterinary Journal,** 159.:37-56, 2000.

STEMKE, G. W. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the aetiological agent of enzootic pneumonia. **Molecular Cellular Probes,** 3: 225-232, 1989.

STRAIT, E.L.; ERICKSON B.Z.; THACKER, E.L.; Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolated, In: **Proceedings of AASV Congress,** Des Moines, Iowa. p. 95-96, 2004.

SUTER, M.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Stimulation of Immunoglobulin containing cells and sotype-sepecific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific pathogen free pigs. *Infect. Immun.* 49: 615-620, 1985.

TAYLOR, D.J. The lung: Pathology of the pig, a diagnostic guide. Ed Sims Ld, Glastonury **JRW**, Agriculture Victoria. p. 219-238., 1996.

TANG, Y. W.; POCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostic of infectious diseases. **ACTA Veterinaria Hungarica.**, 43: 2021-2038, 1997.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança:** Uma Abordagem Multidisciplinar. v.2, p.295, 1998.

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**, 37:620-627, 1999.

THACKER B.J. & THACKER E.L. Influence of maternally-derived antibodies on the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. In: **Proceedings of AASV.** Nashville, Tennessee. p.:513-515, 2001

TORTORA, G.J.; VICCA, J. Mecanismos microbianos de patogenicidade. In: **Microbiologia.** 6.ed. Porto Alegre, RS: Artmed,. p.421-440,. 2000.

TULLY, J. G.; BOVÉ, J.M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R. F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*; proposed elevation of a monophiletic cluster of arthropod associated mollicutes to ordinal rank (*entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*entomoplamataceae* fam. No.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descritons of the Order *Mycoplasmatales*, Family *Mycoplasmataceae*. **International Journal Systematic Bacteriology**,.43;.378-85. 1993.

VERDIN, E.; SAILLARD, C.; LABBÉ, A. BOVÉ, J. M.; KOBISCH, M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. **Veterinary Microbiology**, 76:31-40, 2000.

VICCA J.; STAKENBORG, T; MAES, D.; BUTAYE, P.; PEETERS, J.; KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F: Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, 97:177-190, 2003.

WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.155-162, 2003.

WALLGREN, P.;SCHWAN O.; MATTOSON,S.; FOSSUM, C.: Humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. **Vet. Microbiol.**, 60: 193-205, 1998

WILTON, J.L.; SCARMAN A.I.L.; WALKER, M.J.; DJORDEVIC, S.P.: Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesion gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbiology**, 144: 1931-1943, 1998.

YAMAGUTI, M. Detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela reação de cadeia de polimerase em suínos apresentando problemas respiratórios. **Dissertação de mestrado**, UEL - Universidade Estadual de Londrina, 2003.

YAMAGUTI, M; PIFFER, I.A.; KLEIN, C.S., KICH, J.D.; KUCHIISHI, S.S.; RAMENZONI,M.L.F.; VISOTTO, R.; MULLER, E.E.; GALHASRDO, J.. Otimização da Reação em Cadeia da Polimerase (Nested-PCR) para Detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* em Suínos. **Resumo**. In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. p. 31-34, 2003.

YAGIHASHI, T. KAZAMA, S. TAJIMA, M.: Seroepidemiology of mucoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme linked immunoorbent assay. **Vet.Microbiol.**, 34: 155-156, 1993.

YAMAMOTO, R. *Mollicutes*. In: BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y. **Tratado de microbiología veterinaria**. Zaragoza: Editorial Acribia. p.241-249, 1994.

YOUNG, T.F.; ROSS, R.F.: Assessment of antibody response of swine infec with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immnoblotting. Am. **J.Vet.Res.**, 48: 651- 656, 1987.

ZHANG, Q.;YOUNG, T.F.; ROSS, R.F.: Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, 62:.1013-1019, 1994.

ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F.: Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. **Infection and Immunity**, 63: 1013-1019, 1995.

ZIELINSKI, C., ROSS, F.R. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. **American Journal of Veterinary Research**, 54:.1262-1269, 1993.

**ANEXO I. ATO INSTRUÇÃO NORMATIVA/SDA Nº 19 DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002**

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA – SUBSTITUTO, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 83, inciso IV, do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 08 de dezembro de 1998, nos termos do disposto no Regulamento de Defesa Sanitária Animal, aprovado pelo Decreto nº 24.548, de 03 de julho de 1934.

Considerando a importância econômica da suinocultura e a necessidade de manter um nível sanitário adequado nas granjas que comercializam, distribuem ou mantenham reprodutores suídeos para multiplicação animal, a fim de evitar a disseminação de doenças e assegurar níveis desejáveis de produtividade, e o que consta do Processo nº 21000.005128/2001-29, resolve:

Art. 1º Aprovar as Normas a serem cumpridas para a Certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos, em anexo.

Art. 2º A comercialização e distribuição, no Território Nacional, de suídeos destinados à reprodução, assim como a sua participação em exposições, feiras e leilões, somente serão permitidas àqueles procedentes de Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC).

Parágrafo único. As entidades mantenedoras de animais com finalidade de multiplicação animal deverão obedecer aos requisitos para Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas.

Art. 3º Delegar competência ao Diretor do Departamento de Defesa Animal (DDA), para baixar Normas complementares necessárias à certificação de granjas de reprodutores suídeos, por proposta da Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários.

Art. 4º Recomendar, aos Secretários de Agricultura e às autoridades de defesa sanitária animal competentes nos Estados e no Distrito Federal, apoio para o desenvolvimento das atividades que decorram desta Instrução Normativa.

Art. 5º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação. Art. 6º Fica revogada a Instrução Normativa nº 12, de 23 de junho de 1999.

## ANEXO

### NORMAS PARA A CERTIFICAÇÃO DE GRANJAS DE REPRODUTORES SUÍDEOS

#### 1. DAS DEFINIÇÕES

1.1. Para efeito destas Normas, considera-se:

1.1.1. Suídeo: qualquer animal do gênero *Sus* sp;

1.1.2. Suídeos de reprodução: suídeos mantidos em uma granja e utilizados para a multiplicação da espécie;

1.1.3. Entidades mantenedoras de materiais de multiplicação de suídeos: centrais de inseminação artificial e unidades disseminadoras de genes;

1.1.4. Granja de reprodutores: estabelecimento ou propriedade onde são criados ou mantidos suídeos para a comercialização ou distribuição, cujo produto final seja destinado à reprodução;

1.1.5. Granja de reprodutores suídeos certificada (GRSC): granja que atenda integralmente às disposições básicas e específicas estabelecidas para a certificação. As granjas terão sua certificação baseada no monitoramento sorológico e na sua classificação sanitária previstos nessa Instrução Normativa;

1.1.6. Proprietário: qualquer pessoa, física ou jurídica, que mantenha em seu poder suídeos cujo produto final seja destinado à reprodução;

1.1.7. Serviço oficial: o órgão de defesa sanitária animal federal, estadual ou municipal;

1.1.8. Médico veterinário oficial: o profissional do serviço oficial;

1.1.9. Médico veterinário credenciado: o profissional credenciado pelo serviço oficial, de acordo com o Decreto Lei nº 818, de 5 de setembro de 1969;

1.1.10. Responsável técnico: médico veterinário, indicado pelo proprietário, responsável pelo cumprimento das condições estabelecidas nestas Normas;

1.1.11. Laboratório oficial: laboratório pertencente à rede do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na área animal;

1.1.12. Laboratório oficial credenciado: laboratório pertencente à instituição pública que recebe, por delegação de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ato de credenciamento;

1.1.13. Produção de reprodutores: tem como finalidade principal ou produto principal futuros reprodutores machos e fêmeas;

1.1.14. Produção de reprodutores em ciclo completo: granja produtora de suídeos para reprodução, envolvendo todas as fases em prédios, numa mesma área geográfica;

1.1.15. Sítio 1: unidade produtora de leitões, envolvendo as fases de cobertura, gestação, maternidade, desmame e, dependendo da empresa, a creche e central de inseminação de uso exclusivo;

1.1.16. Sítio 2: unidade que recebe os leitões do sítio 1 para criá-los na fase de creche, creche e crescimento ou apenas crescimento até a entrega para reprodução;

1.1.17. Sítio 3: unidade que recebe os suídeos do sítio 2 para criá-los até o momento da entrega para reprodução;

1.1.18. Monitoria sanitária: são formas sistemáticas e periódicas de constatar, qualificar e quantificar o nível de saúde de granjas de reprodutores para determinada doença ou infecção;

1.1.19. Grau de vulnerabilidade: conjunto de normas destinadas a evitar a introdução de agentes patogênicos na granja de reprodutores;

1.1.20. Biossegurança: desenvolvimento e implementação de normas rígidas para proteger o rebanho de suídeos contra a introdução e disseminação de agentes infecciosos na granja de reprodutores;

1.1.21. Dados zootécnicos: conjunto de parâmetros de produtividade de uma granja de reprodução, que permite caracterizar e avaliar o seu desempenho produtivo;

1.1.22. Quarentenário: local onde se mantém em isolamento e observação animais recém-adquiridos, aparentemente sadios, para realização de testes diagnósticos ou medidas profiláticas destinadas a evitar a introdução de agentes patogênicos em granjas de reprodutores.

## 2. DAS CONDIÇÕES BÁSICAS

2.1. As condições básicas a serem atendidas pelas granjas de reprodutores de suídeos, objetivando a certificação oficial das mesmas, são as seguintes:

2.1.1. Estar registrada no setor competente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e manter um sistema de registro que permita a identificação dos animais e da ascendência genética dos mesmos.

2.1.2. Possuir cadastro junto ao Serviço Oficial da jurisdição onde esteja localizada, bem como um registro zoossanitário completo (nascimentos, mortes, diagnóstico de doenças, tratamentos, programa de vacinação e monitoria sanitária dos suídeos de reprodução), com as informações relativas a todos os suídeos alojados e que deverão estar à disposição do Serviço Oficial;

2.1.3. Adotar práticas de biossegurança contra a introdução de agentes patogênicos e para evitar a disseminação ou exacerbação de doenças na granja de reprodutores;

2.1.4. Possuir assistência médico-veterinária e responsável técnico, que a representará junto ao serviço oficial, notificando as ocorrências de ordem sanitárias e dados zootécnicos, por meio de relatório técnico trimestral enviado ao Serviço Oficial, ou de imediato, no caso de doenças de notificação imediata. Caberá ao responsável colher materiais para os exames laboratoriais e realizar exames clínicos de rebanho, bem como implantar programa de limpeza e desinfecção e de vacinações, mantendo protocolos dessas medidas e das demais atividades de controle de saúde anotados, de acordo com o estabelecido nestas Normas, supervisionado pelo serviço oficial;

2.1.5. A colheita de material para exames laboratoriais, inoculação de tuberculina e sua leitura com o fim de monitoria sanitária das granjas para certificação e recertificação deverá ser executada sob supervisão direta do Serviço Oficial, sendo os custos dos exames às expensas do proprietário;

2.1.6. O ingresso de suídeos para reposição e material de multiplicação animal na granja de reprodutores certificada somente poderá ocorrer quando procederem de GRSC e certificada pelo menos para as mesmas doenças opcionais.

2.1.7. A certificação terá validade de seis meses. Será concedida, em modelo próprio, pelo serviço oficial, com base na apresentação dos resultados dos exames clínicos de rebanho e laboratoriais, realizados em laboratórios oficiais ou oficiais credenciados e, no caso da tuberculose, na apresentação dos resultados das provas

diagnósticas realizadas pelo responsável técnico da granja e na comprovação do atendimento das demais exigências estabelecidas nestas Normas;

2.1.8 Os suídeos em trânsito deverão estar acompanhados por documento oficial de trânsito e de cópia do certificado de GRSC, autenticada por servidor oficial;

2.1.9. A certificação poderá ser suspensa a qualquer momento pelo serviço oficial, motivada pelo não atendimento de quaisquer das determinações estabelecidas nestas Normas ou a pedido do interessado.

### 3. DAS CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

3.1. As condições sanitárias e de biossegurança a serem atendidas pelas granjas de reprodutores de suídeos para a certificação são:

3.1.1. Dispor de cerca periférica com entrada única e sistema de desinfecção para o ingresso de pessoas ou veículos;

3.1.2. Possuir embarcadouro/desembarcadouro localizado junto à cerca periférica;

3.1.3. Dispor de um livro de visitas, identificando a última data e local de visitas a outras granjas de suídeos, laboratórios, matadouros-frigoríficos ou outros locais com a presença de suídeos, sendo de 24 horas o período mínimo de vazio sanitário;

3.1.4. Dispor de um sistema de desinfecção para a introdução de materiais e equipamentos na granja;

3.1.5. Possuir vestiário com paredes e pisos impermeáveis, com banheiro, chuveiro e vestuário para o pessoal da granja de reprodutores e visitantes;

3.1.6. Utilizar água de fonte conhecida, que não seja de cursos naturais, para o abastecimento da granja, com reservatórios protegidos, limpos e desinfetados, no mínimo, a cada seis meses;

3.1.7. Dispor de licença do órgão ambiental estadual competente, com relação ao tratamento e destino dos dejetos;

3.1.8. Dispor de um sistema adequado, aceito pelo órgão oficial competente, para destino de cadáveres e restos de partos (natimortos, mumificados, placentas);

3.1.9. As granjas de reprodutores de dois sítios de produção deverão cumprir, em ambos os sítios, todos os requisitos exigidos para certificação, independente se os sítios estão localizados na mesma propriedade ou não;

3.1.10. As granjas de três sítios de produção deverão cumprir todos os requisitos para certificação nos sítios 1 e 3, sendo que no sítio 2, deverão cumprir apenas as condições de biossegurança, independente se os sítios estão localizados na mesma propriedade ou não.

3.1.11. Nas granjas de reprodutores de 2 ou 3 sítios, em caso de suspeita de qualquer uma das doenças objeto de certificação destas Normas, em qualquer um dos sítios de produção, a critério do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, deverão ser solicitados exames, nos demais sítios, de acordo com a amostragem definida nestas Normas, inclusive fora da data prevista de recertificação, podendo ser suspensa a certificação dos sítios de produção, até o resultado dos exames.

3.2. As granjas de reprodutores de suínos certificadas, cumpridos os itens anteriores, serão avaliadas para uma classificação inicial e reavaliadas anualmente, quanto ao grau de vulnerabilidade das mesmas à entrada de agentes patogênicos, conforme a tabela 1.

Tabela 1. AVALIAÇÃO DO GRAU DE VULNERABILIDADE DE GRSC À ENTRADA DE PATÓGENOS EXTERNOS.

Variáveis	Crítérios	Pontuações	Obtido na granja
1. Distância com a unidade de produção de suínos mais próxima não certificada ou abatedouro de suínos.	Maior de 3,5 km	0	
	De 1 a 3,5 km	1	
	De 500 m a 1 km	2	
	menor de 500m	3	
2. Densidade de rebanhos suínos em um raio de 3,5 Km	1 rebanho	0	
	2 a 3 rebanhos	1	
	4 ou mais rebanhos	2	
3. Granjas fornecedoras de suídeos para reposição do plantel.	reposição própria ou por isterectomia	0	
	1 fornecedor	1	
	2 fornecedores	2	
	3 ou mais fornecedores	3	
4. Distância de rodovia que transporta suínos	maior de 500m	0	
	de 300m a 500m	1	
	menor de 300m	2	
5.1 Qualidade do isolamento da granja - cercas	ótima – cerca dupla intercalada com cinturão verde	0	
	muito boa – cerca de tela afastada pelo menos 50m dos galpões	1	
	boa – cerca de tela com menos de 50m dos galpões	2	
	razoável – apenas cerca não telada	3	
5.2 Qualidade do isolamento da granja – cinturão verde	distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde de no mínimo 50m	0	
	distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde menor que 50 m.	1	
	não possui cinturão verde	2	
6. Controle de visitas na granja	ocasional com vazio sanitário de 72 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	0	
	ocasional com vazio sanitário de 48 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	1	
	ocasional com vazio sanitário de 24 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa.	2	

Continua ....

Continuação ...			
7. Existência de quarentenário	sim, distante no mínimo 500m com cinturão verde ou não introduz suínos no rebanho.	0	
	sim, mas com menos de 500m do rebanho ou sem cinturão verde.	1	
	Introduz os suínos de reposição sem fazer quarentena	2	
8. Ração fornecida aos animais	não usa farinhas de origem animal	0	
	usa farinhas de origem animal	2	
9. Origem da ração fornecida aos animais	fábrica própria na propriedade	0	
	fábrica de terceiros	1	
10. Transporte do alimento usado na granja	graneleiro ou caminhão que não transporta suínos.	0	
	caminhão que transporta suínos	2	
Pontuação total obtida na granja			

3.2.1. Classificação das granjas quanto ao grau de vulnerabilidade a patógenos externos:

- a) granja “A”: bem protegida - de 0 a 5,0 pontos, desde que não tenha nenhum critério com pontuação 2 ou 3;
- b) granja “B”: vulnerabilidade baixa - até 8,0 pontos, desde que não tenha nenhum critério com pontuação 3 e não se enquadre como granja “A”;
- c) granja “C”: vulnerabilidade moderada - de 8,0 a 12,0 pontos, desde que não se enquadre como granja “B”;
- d) granja “D”: altamente vulnerável - com 13,0 ou mais pontos.

3.2.2. Na avaliação do grau de vulnerabilidade para Centrais de Inseminação Artificial, o item 3, constante na tabela 1, não será aplicado. Entretanto, todos os reprodutores introduzidos na CIA deverão ser submetidos aos testes para as enfermidades básicas da certificação.

### 3.3. Dos níveis sanitários da GRSC

3.3.1. Toda granja de suídeos certificada deverá ser livre de peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose, sarna e livre ou controlada para leptospirose.

3.3.2. As condições a ser atendidas para a Peste Suína Clássica - PSC - são as seguintes:

3.3.3. Realizar provas sorológicas, com intervalo de seis meses, por meio de teste ELISA, utilizando-se kit registrado no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, devendo os soros que apresentar resultados suspeitos ou positivos ser submetidos a provas complementares diferenciais, por meio de testes de neutralização, incluindo os diferenciais para Diarréia Bovina a Vírus.

3.3.4. A granja de reprodutores terá cumprido as condições sorológicas para PSC se todos os testes forem negativos. No caso de positividade, devem ser aplicadas as medidas estabelecidas nas normas de profilaxia da peste suína clássica, aprovadas pelas Normas vigentes.

3.3.5. As condições a ser atendidas para a Doença de Aujeszky são as seguintes:

3.3.5.1. Não proceder à vacinação dos suídeos alojados na granja de reprodutores.

3.3.5.2. Realizar provas sorológicas, com intervalo de seis meses, por meio de teste ELISA, utilizando-se kit registrado no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento devendo os soros que apresentar positividade serem submetidos ao teste de neutralização;

3.3.5.3. A granja de reprodutores terá cumprido as condições sorológicas para doença de Aujeszky se todos os testes forem negativos. No caso de positividade, a certificação será suspensa e a sorologia deverá ser repetida em 100% do plantel de reprodutores, com intervalo de 30 e 60 dias. No caso de ser mantida a positividade, a granja perderá a certificação.

3.3.6. Para a brucelose, devem ser realizadas provas sorológicas, com intervalo de seis meses, utilizando o antígeno acidificado tamponado ou outro aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e indicado para o caso, devendo os soros reagentes ser submetidos a provas complementares do 2-mercaptoetanol ou fixação de complemento;

3.3.6.1. A granja de reprodutores terá cumprido as condições sorológicas para a brucelose se todos os testes forem negativos. No caso de positividade, a granja terá sua certificação suspensa, eliminando os positivos e retestando o plantel, na sua totalidade em até 30 dias. Persistindo a positividade, a granja perderá a certificação.

3.3.7. Para a tuberculose, deverão ser testados reprodutores machos e fêmeas, por amostragem, conforme tabela do item 3.3.11.1, com intervalo de 6 (seis) meses, em prova comparativa com tuberculina PPD bovina e PPD aviária.

3.3.7.1. A leitura deverá ser feita 48 horas após, com uso de régua milimétrica, medindo-se o diâmetro maior da reação. A interpretação do teste será dada com base no rebanho, considerando a média aritmética das reações superiores a 0,5 cm.

3.3.7.2. A granja terá cumprido as condições exigidas para tuberculose se todos os animais forem negativos para PPD bovina ou se houver reação positiva, desde que a média do diâmetro das reações à PPD bovina seja inferior à média do diâmetro das reações à PPD aviária.

3.3.7.3. A granja será considerada positiva para tuberculose se a média do diâmetro das reações à PPD bovina for maior que a média diâmetro das reações à PPD aviária. Neste caso, a certificação será suspensa, devendo ser aplicadas medidas de saneamento.

3.3.7.4. No caso da média do diâmetro das reações à tuberculina PPD aviária ser maior que a média das reações à tuberculina PPD bovina, a granja será considerada infectada por micobactérias do Complexo avium. Neste caso, a granja não perderá a certificação e deverá ser implantado, no estabelecimento, um programa de controle.

3.3.7.5. Em caso de dúvidas na interpretação das reações às tuberculinas, a granja perderá, temporariamente, a certificação até que seja concluído o diagnóstico, baseado em provas laboratoriais de identificação das micobactérias envolvidas.

3.3.8. Para a Leptospirose, as granjas terão duas opções:

3.3.8.1. Nas granjas de reprodutores consideradas livres de Leptospirose, será obrigatório o controle sorológico, devendo ser realizadas provas sorológicas de microaglutinação, com intervalo de seis meses. Os soros devem ser testados frente aos sorovares *L. canicola*, *L. grippothyphosa*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. bratislava* e, apresentando resultados negativos.

3.3.8.2. A critério da autoridade sanitária competente, poderão ser acrescentados outros sorovares.

3.3.8.3. As granjas de reprodutores consideradas controladas para Leptospirose, pelo uso de vacina, deverão conter no Certificado a expressão "Granja vacinada para Leptospirose", devendo a vacina a ser utilizada conter todos os sorovares constantes no item 3.3.8.1.

3.3.9. Para a sarna, serão utilizados dois exames de raspado de pele, com intervalo de 2 a 3 meses, de 5 reprodutores e 5 suínos de terminação, identificados pelo

veterinário oficial, por meio de exame clínico, como potenciais portadores de sarna. Todos deverão apresentar resultados negativos.

3.3.9.1. Caso positivo, a certificação será suspensa, devendo ser providenciada a erradicação, por meio de tratamento medicamentoso, elaborado e implantado pelo responsável técnico.

3.3.10. As granjas que não cumprirem integralmente as condições mencionadas nestas Normas perderão a condição de Granjas de Reprodutores Suídeos Certificada.

3.3.11. As granjas serão certificadas após a realização de dois testes negativos consecutivos com intervalo de dois a três meses, para todas as doenças previstas nesta Instrução, exceto para sarna. Neste caso específico será obedecido ao disposto no item 3.3.9.

3.3.11.1. No primeiro teste, será examinado 100% do rebanho de reprodutores. Na amostragem para o segundo teste e monitoramentos posteriores, será utilizada a tabela 2. Em se tratando de granjas novas, que forem povoadas com o acompanhamento do Serviço Oficial, por animais provenientes de granjas já certificadas, não haverá necessidade da colheita de 100% do plantel, bastando obedecer à tabela 2.

Tabela 2 - amostragem de granjas de reprodutores suídeos certificadas

Nº REPRODUTORES NO REBANHO	Nº DE ANIMAIS A AMOSTRAR	Nº REPRODUTORES NO REBANHO	Nº DE ANIMAIS A AMOSTRAR
10	10	350	54
20	19	400	55
30	26	450	55
40	31	500	56
50	35	600	56
60	38	700	57
70	40	800	57
80	42	900	57
90	43	1000	57
100	45	1200	57
120	47	1400	58
140	48	1600	58
160	49	1800	58
180	50	2000	58
200	51	3000	58
250	53	4000	58
300	54	MAIS de 5000	59

Número de animais para colheita de sangue e realização do Teste de Tuberculinização Comparada, em função do número de reprodutores suídeos no plantel, considerando uma prevalência estimada em 5% e um nível de confiança de 95%.

#### 4. DOENÇAS DE CERTIFICAÇÃO OPCIONAL

A critério do proprietário da granja de reprodutores, o mesmo poderá requerer junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a partir de junho de 2002, a certificação opcional de livre para quaisquer das doenças abaixo:

##### 4.1. Rinite Atrófica Progressiva (RAP):

4.1.1. A granja de reprodutores será considerada livre de RAP se:

- Não for constatada a presença de *Pasteurella multocida* D toxigênica em 3 exames consecutivos iniciais, com intervalo de 30 dias. Deverão ser coletados suabes nasais e de amídalas de 30 leitões com 8 semanas de idade que não estejam sob regime de antibióticos. Os suabes deverão ser acondicionados em meio de transporte (0,5 ml) e mantidos a 4°C. No laboratório, os suabes serão semeados em meio seletivo agar 8HPG, agar sangue e colocados de volta no meio de transporte. Este será agitado em vortex e, com as suspensões obtidas, será formado um pool de cinco animais (0,10ml x 5 = 0,50ml), que será inoculado em camundongo. Após 7 dias, os camundongos serão sacrificados para tentativa de isolamento de *P. multocida*. As amostras de *P. multocida* serão submetidas a um teste para identificação de sua toxigenicidade, através de teste ELISA, soroneutralização em células ou PCRs.

- Não for constatado lesões nos cornetos nasais com graduação superior a 1, pelo método de avaliação visual (na escala de 0 = ausência de lesão; 1 = leve desvio da normalidade; 2 = lesão moderada e 3 = lesão grave), em 3 exames consecutivos iniciais, com intervalo de 30 dias. Os exames deverão ser realizados em um grupo de, no mínimo, 30 suínos com cinco a seis meses de idade.

4.1.2. Para manutenção da certificação, estes exames deverão ser repetidos, uma única vez, a cada 6 meses, com todos os resultados negativos.

##### 4.2. Pneumonia Micoplásmica (PM)

4.2.1. A granja de reprodutores será considerada livre de Pneumonia Enzoótica se:

- Não for constatada a presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em 3 exames sorológicos consecutivos iniciais, com intervalo de 30 dias, de 30 leitões com mais de 10 semanas de idade. Se houver sorologia positiva e ausência de lesões ao abate, os animais vivos com sorologia positiva deverão ser submetidos à lavagem bronquial e colheita de material para PCR - NESTED e/ou cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

- Não for constatada lesões pulmonares de PM em 3 exames consecutivos iniciais de matadouro, com intervalo de 30 dias, de 30 suínos com 5 a 6 meses de idade. Caso lesões de PM sejam encontradas, as mesmas deverão ser submetidas a exames de histopatologia, seguido de teste de imunoperoxidase ou imunofluorescência para *Mycoplasma hyopneumoniae*.

4.2.2. Para manutenção da certificação esses exames deverão ser repetidos, uma única vez, a cada 6 meses, com todos os resultados negativos.

#### 4.3. Pleuropneumonia Suína (PPS)

4.3.1. A granja de reprodutores será considerada livre de PPS se:

- Não for constatada a presença de sorotipos patogênicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em 3 exames consecutivos iniciais, com intervalo de 30 dias, pelo teste Elisa polivalente, em 30 leitões com 13 ou mais semanas de idade. Dos animais positivos, caso não houver lesões de PPS no exame de matadouro, coletar secreções ou fragmentos de amídalas e submetê-los a exames bacteriológicos direto em meio seletivo, aplicando o processo de separação imunomagnética para isolamento do *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ou submeter ao teste de PCR.

- Não for constatada a presença de lesões de PPS em 3 exames consecutivos iniciais, com intervalo de, no mínimo, 30 dias, de 30 suínos entre 5 a 6 meses de idade. Caso seja observada alguma lesão sugestiva de PPS, estas deverão ser encaminhadas para tentativa de isolamento e sorotipagem de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

4.3.2. Para manutenção da certificação esses exames deverão ser repetidos, uma única vez, a cada 6 meses com todos os resultados negativos.

#### 4.4. Disenteria Suína (DS)

4.4.1. A granja de reprodutores será considerada livre de DS se:

- Não for constatada a presença de *Brachyspira hyodysenteriae* em 3 exames consecutivos iniciais, com intervalo de 30 dias, através de exames laboratoriais, de um pool de fezes de 6 suínos por baía, colhidas de 6 diferentes baias de suínos em crescimento. As fezes serão submetidas ao exame de imunofluorescência direta e confirmada por PCR. A certificação será mantida através de exames semestrais de um pool de fezes de 6 suínos, colhidas em 6 diferente baias de suínos em crescimento.

4.4.2. Para manutenção da certificação esses exames deverão ser repetidos, uma única vez, a cada 6 meses com todos os resultados negativos.

4.5. As GRSC, em relação às doenças de certificação, constantes nos itens 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 serão classificadas em quatro níveis:

- a) Nível 1: livre das quatro doenças opcionais;
- b) Nível 2: livre de pelo menos duas doenças opcionais;
- c) Nível 3: livre de uma doença opcional;
- d) Nível 4: sem doença opcional certificada.

## 5. DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

5.1. A critério do DDA poderão ser incluídas novas enfermidades para certificação.

5.2. As penalidades advindas do não cumprimento das normas disciplinadas nesta Instrução Normativa estão previstas em legislação da Defesa Sanitária Animal, independente da perda da certificação.

5.3. Os casos não previstos nesta Instrução Normativa serão resolvidos pelo Departamento de Defesa Animal

**ANEXO II. Técnica de rotina em histopatologia**

1. Recortar o tecido pulmonar em fragmentos de cerca de meio centímetro de espessura e fixar em formol a 10%;
2. Desidratar e diafanizar a amostra, por meio de um gradiente crescente de concentrações de álcoois (70% até 100%) e xileno, respectivamente;
3. Efetuar a inclusão na parafina, com ponto de fusão de 60 a 68°C através de um processador automático de tecidos;
4. Transferir a amostra para um molde de incrustação de parafina fundida e mantendo em temperatura ambiente até o completo endurecimento;
5. Remover o molde e fixar o bloco de parafina no micrótomo, orientando-o apropriadamente em relação à lâmina de corte;
6. Efetuar o aparo até a exposição do tecido;
7. Efetuar os cortes histológicos com espessura de três (03) micrômetros;
8. Distender os cortes em uma lâmina contendo albumina;
9. Secar em estufa à temperatura de 84°C por cerca de 4 horas;
10. Remover a parafina com xileno;
11. Re-hidratar com álcool a 100% e 96%;
12. Proceder a coloração pela técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E);
13. Proceder à desidratação, clareamento, cobertura com meio resinoso (Entelan) e fixação de lamínula.

### **ANEXO III. Método Clássico Fenol/Clorofórmio/Etanol**

#### **Reagente e Soluções**

1. Tampão extração (Lise)
  - Tris Base 2M
  - EDTA 0,5M
  - Sódio Dodecil Sulfato 10%
  - Proteinase K 10mg/mL
  - H<sub>2</sub>O MilliQ q.s.p.
2. Tripsina Versene 0,25%
3. Fenol Saturado
4. Clorofórmio
5. Acetato de Sódio 3M pH 5.2
6. Isopropanol
7. Etanol absoluto
8. Etanol 70%
9. TE 1x Rnase 10µg/mL

#### **Método:**

1. Colocar 100 mg de cada amostra, em microtubos novos de 2mL;
2. Fragmentar a amostra com auxílio de lâminas de bisturi novas;
3. Adicionar 500µL de Tripsina Versene 0,25%;
4. Manter no Shaker (agitação de 7-10) overnight sob refrigeração;
5. Congelar a 80° negativos;
6. Descongelar em geladeira; centrifugar a 10000rpm/20'/4°C
7. Desprezar o sobrenadante;
8. Adicionar 500µL de tampão de lise;
9. Manter em agitação por 16-24 horas a 37°C;
10. Identificar 3 baterias de microtubos de 2mL e 1 bateria de 1,5mL;
11. Adicionar à amostra com o tampão de lise, 500µL de fenol saturado e homogeneizar em vortex por 5-10", dentro da capela de exaustão;
12. Centrifugar a 5000/15'/20°C;

13. Transferir a fase líquida (superior) para um novo microtubo de 2mL;
14. Adicionar novamente 500µL de fenol saturado e homogeneizar em vortex por 5-10", dentro da capela exaustão;
15. Centrifugar a 10000/10'/20°C;
16. Transferir a fase líquida (superior) da amostra (tomando o cuidado para não aspirar proteína e traços fenólicos) para um novo microtubo de 2 mL, medindo o volume recuperado;
17. Adicionar 1-2 volumes (do recuperado) de clorofórmio a 20°C negativos;
18. Homogeneizar em vortex e centrifugar a 10000 rpm/10'/4°C;
19. Transferir a fase líquida (superior) para um novo microtubo de 2mL (medindo o volume recuperado) e adicionar 1-2 volumes de clorofórmio a 20°C negativos;
20. Homogeneizar e centrifugar a 10000 rpm/10'/4°C;
21. Transferir a fase líquida (superior) para um novo microtubo de 1,5mL, medindo o volume;
22. Adicionar 10% do volume recuperado da amostra de Acetato de Sódio 3M pH 5.2;
23. Adicionar o mesmo volume da amostra de Isopropanol gelado 20°C negativos e inverter o microtubo delicadamente;
24. Manter em freezer a 20°C negativos de 4 - 24 horas quando utilizar o Isopropanol; podendo também optar pelo uso de Etanol absoluto em 2 volumes do volume recuperado, mantendo em freezer a 80°C negativos por 1 hora;
25. Centrifugar 10000/30'/4°C;
26. Desprezar o sobrenadante por inversão do microtubo;
27. Ressuspender o DNA com 500 µl de Etanol 70% e com temperatura de 0 a 2°C;
28. Centrifugar 10000/15'/4°C;
29. Desprezar o sobrenadante por inversão e secar sobre papel absorvente por 60" em temperatura ambiente ou 15" a 37°C;
30. Ressuspender o DNA em 200µl de TE 1x RNase na concentração de 10µg/mL;
31. Manter em geladeira por até 2 dias ou em freezer a 20°C negativos.

**ANEXO IV. Extração Método “Quente e Frio “**

1. Centrifugar uma alíquota de 200  $\mu$ L da cultura de *M. hyopneumoniae* a 10000 rpm por 10 minutos, desprezando o sobrenadante;
2. Adicionar ao pellet 100 $\mu$ l de PBS, mantendo em agitação por 30 segundos;
3. Centrifugar desprezando o sobrenadante;
4. Adicionar 200  $\mu$ L de água MilliQ submetendo a temperatura de 100°C durante 10 minutos em banho-seco;
5. Transferir para freezer a 20°C negativos por 5 minutos;
6. Centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos;
7. Armazenar o sobrenadante à temperatura de 20°C negativos.

**ANEXO V.** Quantificação do DNA nas amostras de pulmão de suíno, utilizando o método de extração Fenol/Clorofórmio/Etanol.

Tatuagem	Concentração do DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Grau de Pureza (260/280)
A01	270	2.250
A02	596	2.869
A03	115	2.091
A04	200	1.143
A05	315	2.200
A06	205	1.952
A07	180	2.514
A08	45	1.800
A09	65	1.500
A10	160	152.4
A11	300	1.667
A13	180	2.400
A14	575	2.545
A15	80	1.875
A16	305	1.034
A17	280	2.636
AR1	60	1.716
AR3	205	2.333
AR4	190	2.375
AR5	453	2.360
AR6	521	3.275
AR7	115	1.000
AR9	125	1.923
AR10	350	1.004
AE2	278	2.133
AE3	20	2.333
AE4	375	2.876
AE5	20	1.500
AE6	925	2.529

Continua ...

Continuação ...

Tatuagem	Concentração do DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Grau de Pureza (260/280)
BE4	240	1.920
BB8	75	1.250
BE7	65	2.143
BF5	175	2.059
BE6	65	2.600
BE9	10	1.250
BB3	35	2.333
BB5	155	1.000
BB6	245	1.360
BF3	20	2.500
BB2	295	1.967
BF4	325	2.241
BB1	465	1.000
BF6	370	1.565
BE5	405	1.976
BE2	470	2.043
BE1	370	1.194
BB9	275	1.812
BF1	140	1.817
BE8	45	1.800
CF1	1.700	2.086
CF2	530	1.943
CE1	3.625	2.475
CE3	2.220	2.267
CE4	280	2.074
CE5	1.485	2.216
CE6	1.310	2.165
CR3	815	1.987
CR6	1.545	2.289
CR7	330	2.129
CR8	820	2.243
CR9	1.070	2.063