

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA CARGA INFECTANTE DE *Mycoplasma*
hyopneumoniae E DA IMUNOPATOLOGIA DA FASE CLÍNICA DA
PNEUMONIA ENZOÓTICA EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS**

Henrique Meiroz de Souza Almeida

Médico Veterinário

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA CARGA INFECTANTE DE *Mycoplasma*
hyopneumoniae E DA IMUNOPATOLOGIA DA FASE CLÍNICA DA
PNEUMONIA ENZOÓTICA EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS**

Discente: Henrique Meiroz de Souza Almeida

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

2019

A447a Almeida, Henrique Meiroz de Souza
Avaliação da carga infectante de *Mycoplasma*
hyopneumoniae e da imunopatologia da fase clínica da
Pneumonia Enzoótica em suínos experimentalmente infectados
/ Henrique Meiroz de Souza Almeida. -- Jaboticabal, 2019
72 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Luis Guilherme de Oliveira
Coorientador: Hélio José Montassier

1. Doenças infecciosas. 2. Imunologia. 3. Citocinas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA CARGA INFECTANTE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E DA IMUNOPATOLOGIA DA FASE CLÍNICA DA PNEUMONIA ENZOÓTICA EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

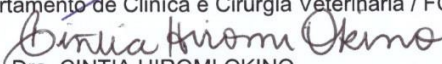
AUTOR: HENRIQUE MEIROZ DE SOUZA ALMEIDA

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

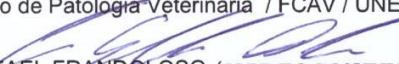
COORDENADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CINTIA HIROMI OKINO
EMBRAPA-Pecuária Sudeste / São Carlos/SP


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. RAFAEL FRANDOLOSO (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade de Passo Fundo / Passo Fundo/RS


Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Henrique Meiroz de Souza Almeida é natural da cidade de Campinas-SP, nascido no dia 19 de março de 1990. Gradou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP câmpus Jaboticabal no ano de 2012. Ingressou no programa de mestrado em Medicina Veterinária (área de concentração Medicina Veterinária Preventiva), em agosto de 2013 na mesma instituição, concluindo em 2015. Iniciou o curso de doutorado em Medicina Veterinária (área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva) em março de 2016. De agosto de 2016 a agosto de 2017 fez período de sanduíche no Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine (VDPAM) – Iowa State University, Ames – Iowa, EUA, sob orientação da Profa. Dra. Bailey Arruda. Atualmente está concluindo o curso do doutorado pela FCAV/Unesp Jaboticabal. Atua principalmente nas linhas de pesquisa: enfermidades infecciosas dos animais domésticos com ênfase em enfermidades respiratórias de suínos, imunologia e epidemiologia de doenças de suínos.

“Onde quer que haja mulheres e homens,
há sempre o que fazer,
há sempre o que ensinar,
há sempre o que aprender.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Jazon Romilson de Souza Almeida e Rejane Cléa de Meiroz Grillo, por terem me dado todo o suporte que sempre precisei, tanto emocional com educacional, mas principalmente por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse a esse ponto. Essa vitória é principalmente de vocês. Meu mais profundo obrigado! Amo vocês.

Agradeço a minha irmã Mariana que mesmo na distância sempre soube se fazer presente na minha vida, sempre foi minha melhor conselheira, aquela que me jogou para frente, que sempre advogou por mim e me deu todo o suporte no momento que mais precisei. Você é minha inspiração e minha parceira para toda a vida! Te amo.

Agradeço ao Gabriel Rossi, amigo e companheiro para todas as horas. Muito obrigado por todo apoio, por me consolar com quando as coisas iam mal, por comemorar comigo quando as coisas iam bem, por acreditar em mim, e mesmo estando longe sempre estar perto nem que seja pela tela do celular. Espero ter sua companhia por muitos anos que virão :).

Agradeço aos meus irmãos André e Felipe bem como a todos meus familiares que torceram por mim, me apoiaram e sempre confiaram no meu potencial na vida e nessa jornada da pós-graduação. Muito obrigado!

Não podia deixar de agradecer à família que escolhi: Felipe, Caio, Luísa, Sílvia, Gabriel. Tenho tanto amor por essas criaturas que não acaba mais. Me desculpem por ser ausente as vezes, levo vocês sempre comigo onde quer que eu esteja e onde quer que eu vá. Obrigado por sempre me ensinarem coisas novas, pela companhia todos esses anos e por tornarem essa jornada da vida mais fácil (e mais engraçada) ao lado de vocês.

Agradeço aos meus irmãos os animais, que no geral contra sua vontade abdicaram da vida para que eu pudesse conhecê-los melhor. Aproveito também, para pedir perdão por toda dor, desconforto, angústia e injúria que infelizmente lhes causei.

Sei que um mero parágrafo de agradecimento está longe de ser suficiente, mas espero de verdade um dia poder, de alguma forma, recompensá-los.

Agradeço aos colegas que a vida de veterinário me deu: Victor, Bruno, Ana Maria, Tatiana, Bruno (e o recém-chegado Caetano), Felipe, Cássia, Nathália e Gabriela. Obrigado por sempre estarem do meu lado e me ajudarem a ser uma pessoa melhor sempre! Morro de saudades de vocês diariamente.

Aos colegas da equipe suínos: Marina, Gabriel, Karina, Maria Eugênia, Marcela e Danielle por terem sempre me ajudado, me ensinado e pela paciência comigo. Essa tese também é fruto do trabalho e suor de vocês, uma vez que sozinha nunca teria conseguido chegar onde cheguei. Muito obrigado também por todas conversas, espetinhos, desabafos e companhia nessa jornada da pós-graduação.

Gostaria de agradecer ao Prof. Luís Guilherme pelo convite para fazer mestrado, por sempre acreditar no meu potencial, por todas condições e suporte que me deu nesses seis anos de orientação para que pudesse me desenvolver como pessoa e como profissional. E claro por todos os ensinamentos técnicos e como pessoa. Muito obrigado.

Aos professores, Prof. Hélio José Montassier, Prof. Luís Antonio Mathias, Prof. Samir Issa Samara, e Prof. Marcos Rogério André, por terem feito parte da minha formação como Médico Veterinário, como pesquisador e por sempre estarem dispostos a me ajudar quando a situação apertava. Muito obrigado.

Agradeço a Profa. Dra. Bailey Arruda pela orientação, pelos ensinamentos e por ter me recebido de braços abertos na Iowa State University durante meu período sanduíche.

Agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo: 2016/18697-6). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Rafael pelo excelente trabalho que contribuiu muito para que eu pudesse chegar até este ponto em paz. Muito obrigado!

Por fim, agradeço a FCAV/Unesp, essa instituição maravilhosa, que foi minha casa por 12 anos, que me ensinou minha profissão, me ensinou a ser pesquisador e me ensinou a ser humano. Deixo parte do meu coração aqui e me joga na vida com eterno carinho por essa faculdade. Espero um dia poder retribuir tudo que me tornei por conta da UNESP, mas por enquanto deixo meu mais profundo obrigado.

SUMÁRIO

	Página
Certificado CEUA	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Abreviaturas	v
Capítulo 1	1
Introdução	1
Revisão de literatura	3
Referências	9
Capítulo 2	13
Introdução	13
Material e métodos	15
Resultados	26
Discussão	35
Conclusão	42
Referências	43
Capítulo 3	48
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	57
Discussão	63
Conclusão	68
Referências	68

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da dinâmica da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* estirpe 232 e da expressão de citocinas durante fase aguda da Pneumonia Enzoótica Suína em suínos experimentalmente infectados**", protocolo nº 9.952/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	01/02/2017 a 07/12/2019
Espécie / Linhagem	Suína
Nº de animais	24
Peso / Idade	Aproximadamente 10kg / entre 22 e 28 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Fazendas especializadas.

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DA CARGA INFECTANTE DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E DA IMUNOPATOLOGIA DA FASE CLÍNICA DA PNEUMONIA ENZOÓTICA EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO- *Mycoplasma hyopneumoniae* é o agente etiológico da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), enfermidade de distribuição mundial, e responsável por prejuízos como queda no ganho de peso diário e aumento da susceptibilidade dos animais acometidos a infecções respiratórias secundárias mais graves. Os principais fatores envolvidos na formação de lesão de consolidação crânio-ventral em suínos infectados ainda não são bem elucidados. Sendo assim, este estudo teve como objetivo esclarecer os principais fatores imunológicos e de carga bacteriana envolvidos na formação de lesões macroscópicas, bem como a dinâmica do agente em quatro pontos no tempo da fase aguda da enfermidade em suínos experimentalmente infectados. Para este fim, 24 suínos provenientes de fazenda livre de *M. hyopneumoniae* foram divididos em dois grupos: controle (n=8) e infectados (n=16). No dia 0 pós-infecção (dpi) os animais do grupo infectado foram inoculados com inóculo de pulmão contendo 10^6 CCU/mL de *M. hyopneumoniae*, pela via intratraqueal, enquanto os animais do grupo controle foram inoculados com 5 mL de meio esterilizado. Semanalmente, os animais foram examinados, pesados e amostras de sangue e suabes nasais foram colhidas. Nos dias 14, 28, 42 e 56 pós-infecção quatro animais infectados e dois controles foram eutanasiados e necropsiados. Durante as necropsias realizou-se o escore de lesão pulmonar macroscópica e foram colhidas amostras biológicas de lesão pulmonar (qPCR e histopatologia), lavado traqueobrônquico (LTB; qPCR) e de três porções anatômicas diferentes de traquéia (qPCR e histopatologia). Amostras de lesão pulmonar também foram coletadas para se analisar a expressão gênica de citocinas envolvidas no processo inflamatório. A quantificação estimada do agente em pulmão mostrou tendência a ser maior nos grupos 42 e 56 dpi, (14 dpi – $1,55 \times 10^3$; 28dpi – $8,4 \times 10^3$; 42 dpi- $3,2 \times 10^4$ e 56 dpi- $1,11 \times 10^5$) ao contrário do escore de lesão macroscópica (14 dpi – 18,45%, 28dpi – 15,84%, 42 dpi- 7,0% e 56 dpi – 6,25%). A expressão dos genes das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e INF- γ mostraram-se significativamente correlacionados com a extensão de área de lesão e outros efeitos patológicos como queda no ganho de peso diário. A quantificação estimada do agente na traqueia mostrou um tropismo pela porção mais caudal deste órgão, bem como a quantificação em LTB mostrou que aos 28 dpi a população do agente na árvore brônquica apresentou seu ápice. As alterações patológicas e carga bacteriana analisadas nos períodos evidenciam que a resposta inflamatória do hospedeiro apresentou maior influência na formação de lesões macroscópicas de consolidação crânio-ventral no pulmão do que a quantidade desse patógeno presente nesse órgão ao longo do tempo.

Palavras-chave: Doenças infecciosas, imunologia veterinária, citocinas, expressão gênica, doenças de suínos

ASSESSMENT OF *Mycoplasma hyopneumoniae* INFECTANT BURDEN AND IMMUNOPATHOLOGY OF SWINE ENZOOTIC PNEUMONIA IN EXPERIMENTALLY INFECTED SWINE

ABSTRACT- *Mycoplasma hyopneumoniae* is the etiological agent of swine enzootic pneumonia (SEP), an infectious respiratory disease reported worldwide and associated with losses in average daily growth and increased susceptibility of infected animals to secondary respiratory infections. The main pathological factors involved in lung macroscopic lesion formation remains not fully understood. Consequently, this study aimed to assess immunopathological factors and *M. hyopneumoniae* infectant loads in macroscopic lesion formation, and to monitor the pathogen dynamics in four intervals of SEP acute phase in experimentally infected swine. 24 pigs originated from *M. hyopneumoniae* free farms were divided into two groups: non-infected control (n=8) and infected (n=16). At day 0 post-infection (dpi) animals of infected group were intratracheally inoculated with lung inoculum containing 10^6 CCU/mL of *M. hyopneumoniae*, while non-infected control group was mock infected with sterilized medium. The animals were monitored and weighted and had serum and nasal swabs collected weekly. At 14, 28, 42 and 56 dpi, four animals from the infected group and two of control group were euthanized and necropsied. During necropsy, the lung macroscopic lesion score was assessed and lesion samples (qPCR, histopathology and gene expression) were collected, as well as bronchus alveolar lavage fluid (BALF; qPCR) and trachea samples from three different anatomic sites (qPCR and histopathology). The estimated quantification of the pathogen in lung lesion samples presented a growing trend (14 dpi – 1.55×10^3 ; 28dpi – 8.4×10^3 ; 42 dpi- 3.2×10^4 and 56 dpi- 1.11×10^5), while the macroscopic lesion score presented an opposite trend (14 dpi – 18.45%, 28dpi – 15.84%, 42 dpi- 7.0% and 56 dpi – 6.25%). The cytokine's TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and INF- γ gene expression were significantly correlated to macroscopic lung lesion score and other pathological effects such as average daily weight gain reduction. The quantification of *M. hyopneumoniae* in tracheal samples confirmed a higher tropism of the pathogen to the lower part of the respiratory tract, and the quantification in BALF samples showed a pathogen population peak at 28 dpi. The pathological responses and the pathogen load analyzed in the evaluated period showed that the host's inflammatory response presented higher influence in macroscopic lung lesion formation compared to the bacterial load in the lesion site.

Keywords: Infectious diseases, veterinary immunology, cytokines, gene expression, diseases of swine

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA- Análise de Variância
BALT- Tecido Linfóide Associado aos Brônquios
BHQ – *Black hole quencher*
FAM- 6-Carboxil-Fluoresceína
°C – graus Celsius
Cq – Quantificação de ciclos
CDRS – Complexo das doenças respiratórias dos suínos
CCU – “*Color changing units*”
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EUA – Estados Unidos da América
ELISA – Ensaio imunoenzimático
PES – Pneumonia Enzoótica Suína
pH – Potencial hidrogeniônico
HE – Corante hematoxilina-eosina
IgG – Imunoglobulina G
IL-1 α – Interleucina 1 α
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
INF- γ – Interferon γ
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
IL-8 – Interleucina 8
IL-10- Interleucina 10
LTB – Lavado Traqueobronquico
Nm – nanometro

ng- nanograma
Kg- kilograma
mg- miligrama
 μ L- microlitro
mL – mililitro
mM – milimolar
TC – Traqueia cranial
TE- Tampão Tris-EDTA
TM – Traqueia média
TCL – Traqueia caudal
LTB – Lavado traqueobrônquico
Dpi – dia pós-infecção
RNA – Ácido ribonucleico
PBS – Tampão fosfato-salino
qPCR – Reação em Cadeia pela polimerase quantitativa
PVP – Polivinilpirrolidona
SDS- Dodecyl -sulfato de sódio
SIV – Vírus da Influenza Suína
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gapdh – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
RPL-4- Proteína ribossômica L4
ACTB- β -actina
HPRT-1- Hipoxantina-ribosil-transferase
YWHAZ- Tirosina 3-Monooxigenase/Triptophano 5-Monooxigenase Proteína Zeta

CAPÍTULO 1 – Considerações Iniciais

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira é uma cadeia produtiva em amplo desenvolvimento que gera milhares de empregos diretos e indiretos, rendendo para a economia brasileira ganhos na casa dos milhões de reais. A crescente modernização e industrialização dessa cadeia produtiva traz outras consequências secundárias que acabam por reduzir a produtividade. Dentre essas barreiras que cerceiam o crescimento da produção estão o aumento da incidência e a dificuldade no controle das enfermidades respiratórias consequente a alterações no ambiente de criação.

Medidas que visam aumentar a produção, como a adoção de alta densidade animal, aliada a outros problemas de manejo, como a baixa circulação de ar nos galpões e a introdução de animais de origens variadas nos rebanhos, propiciam a disseminação de enfermidades infecciosas entre os animais. Nesse contexto, as enfermidades respiratórias ganharam relevante importância na suinocultura mundial por trazerem grandes prejuízos ao setor.

Entre as principais destaca-se a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), enfermidade infecciosa causada por *M. hyopneumoniae*, microrganismo amplamente distribuído nos países que apresentam suinocultura expressiva. Os animais acometidos por essa enfermidade apresentam como principal manifestação clínica tosse seca, não produtiva e, principalmente, queda no ganho diário de peso. Esta última característica é a principal responsável por prejuízos ao produtor. Ainda, gastos com assistência médica veterinária, medidas reforçadas de biossegurança e medicação na ração para controle da enfermidade nas fases de creche e engorda, aumentam o impacto dessa enfermidade na produção de suínos e, conseqüentemente, a colocam em evidência na suinocultura moderna.

Entretanto, apesar da importância já destacada da enfermidade, alguns aspectos referentes ao comportamento e ação patogênica do *M. hyopneumoniae* não estão esclarecidos, como por exemplo os fatores determinantes do aparecimento, extensão e

gravidade das lesões, entre outras características da dinâmica, da patogenia do agente e as relações com as respostas imunes do hospedeiro.

O conhecimento da dinâmica da carga do agente ao longo da fase aguda da enfermidade bem como o mapeamento dos momentos em que há maior ação patogênica no tecido pode servir para orientar aplicação de tratamento aos animais, reduzindo assim além dos gastos com medicamentos o uso indiscriminado de antimicrobianos na ração dos animais, amplamente utilizado no controle da enfermidade. O uso de tais substâncias além de contribuir para a seleção de amostras mais resistentes, exige períodos de carências prévio ao abate dos animais e impacta negativamente na imagem de todo o sistema produtivo, uma vez que o apelo por uma criação livre do uso de substâncias antimicrobianas está no enfoque dos mercados consumidores do mundo inteiro.

Sendo assim, estudos utilizando ferramentas modernas disponíveis e que gerem dados sobre a patogenia da doença são de grande importância para fornecer base para a adoção de métodos mais eficientes na prevenção, controle e aplicação precisa de tratamento nas fases da criação em que os animais são mais acometidos. Dessa forma, propõe-se o monitoramento de uma infecção experimental, causada por uma estirpe moderadamente virulenta por meio de técnicas laboratoriais recentes que podem trazer dados novos, úteis e de grande relevância científica, sobre a dinâmica do agente nos tecidos e órgãos do hospedeiro, o estímulo a resposta imune e a relação desses parâmetros com lesões em pulmão. Sendo assim, estudos como realizado neste projeto são de grande utilidade para a suinocultura, visto que busca esclarecer relações pouco estudadas, ou que são imprecisas, da dinâmica de infecção pelo *M. hyopneumoniae* e a patogenia da PES.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Micoplasmas são as menores bactérias que possuem capacidade de auto replicação. Esses agentes pertencem a classe Mollicutes e são patogênicos para uma enorme variedade de espécies animais, incluindo suínos (Rottem et al., 2003). *Mycoplasma hyopneumoniae* é o principal agente causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES), enfermidade respiratória crônica caracterizada por tosse seca não produtiva e queda no ganho de peso diário dos animais (Vranckx et al., 2012).

A PES apresenta distribuição mundial e causa grandes prejuízos para a suinocultura industrial (Ruiz et al., 2003). Lesões características de pneumonia são comumente encontradas em abatedouros de suínos, estimando-se uma prevalência mundial entre 19% e 79% (Fablet et al., 2012), o que comprova o impacto das enfermidades respiratórias na suinocultura. No estado de Santa Catarina, Brasil, um dos principais produtores de suínos, estudo de Carrijo (2012) encontrou uma prevalência de 96,87% de resultados positivos analisando amostras de lesões pulmonares por nested PCR, enquanto outro estudo detectou em três granjas de uma grande empresa aproximadamente 76% de prevalência de lesões pulmonares sugestivas de PES em animais abatidos (Tamiozzo et al., 2011).

Em outra pesquisa realizada no Estado de São Paulo, foram detectadas 52% de amostras de soro positivas colhidas em um frigorífico na região centro-oeste do estado (Vicente et al., 2013). Apesar de existirem poucos dados sobre a prevalência da PES em regiões do Brasil, é possível notar que a enfermidade é endêmica nas principais regiões produtoras do país. A alta taxa de morbidade da enfermidade resulta na alta prevalência que a enfermidade apresenta a nível mundial (Marois et al., 2007).

Ainda, a PES apresenta baixas taxas de mortalidade nos rebanhos acometidos, sendo o prejuízo na produção mais relacionado ao aumento dos custos com o tratamento, a queda no ganho de peso diário e, conseqüentemente, o menor preço de mercado das carcaças por serem menores (Maes et al., 2008). Outro fator importante como causador de prejuízos é o fato deste agente possuir capacidade de se associar a outros patógenos

respiratórios de suínos causando o chamado complexo das doenças respiratórias de suínos (CDRS), que pode cursar com alta mortalidade e maiores prejuízos (Choi et al., 2003).

Entretanto, os prejuízos financeiros decorrentes da ação desse agente em rebanhos suínos são pouco relatados. Os prejuízos calculados decorrentes da entrada da enfermidade em um rebanho livre foram de U\$ 7,92 por animal (Gillespie, 2013), podendo chegar a U\$ 10,12 quando associado a outro patógenos respiratórios como o vírus da influenza suína (SIV) (Haden et al., 2012). Enquanto os benefícios da erradicação em um rebanho afetado chegaram na casa do U\$837,375 por ano, e aproximadamente U\$ 7,00 a mais por animal abatido (Silva et al., 2019).

Apesar dos prejuízos financeiros causados pela enfermidade serem altos, a erradicação da enfermidade de rebanhos infectados é dificultada por características da infecção. A transmissão entre animais já foi demonstrada, experimentalmente, como sendo lenta e ocorrendo na taxa de 1,28 animais por semana (Roos et al., 2016). Por outro lado, *M. hyopneumoniae* pode persistir e ser excretado por porcas infectadas por até 219 dias pós-infecção, após completa remissão dos sinais clínicos (Pieters et al., 2009). Tal aspecto da epidemiologia chama atenção quando analisado conjuntamente a relatos de que os suínos comumente se infectam durante a fase de maternidade devido o contato próximo entre leitões recém-nascidos e as matrizes infectadas (Casalmiglia & Pijoan, 2000).

Estudo realizado por Pieters et al. (2014) mostrou um significativo aumento nas chances de um leitão de maternidade se infectar, ainda nesta fase, quando existem porcas cronicamente infectadas no mesmo recinto. O quadro pode ser agravado nas fases posteriores da produção, principalmente na creche, onde há a mistura de lotes, e consequentemente, a infecção é amplificada devido ao contato de animais infectados com não infectados (Fano et al., 2005). Ainda, o constante nascimento de leitões, bem como a introdução de marrãs de reposição no rebanho acabam por sempre garantir a presença de novos hospedeiros susceptíveis e consequentemente, garantir a persistência da enfermidade no rebanho (Takeuti et al., 2017; Maes et al., 2018).

Outro fator envolvido na capacidade do patógeno em permanecer no pulmão é a

falha que anticorpos séricos, como IgG, apresentam no combate o *M. hyopneumoniae*, uma vez que por se localizar na superfície do epitélio, a presença de anticorpos séricos não confere imunidade protetora contra a enfermidade, apenas impedindo a disseminação para outros sistemas do organismo do hospedeiro (Thacker & Minion, 2012; Pieters et al., 2014).

Apesar da infecção ocorrer no início da vida, o quadro mais grave da enfermidade se apresenta durante as fases de terminação e engorda quando as lesões pulmonares e os prejuízos no ganho de peso são mais evidentes (Sibila et al., 2009), sendo assim a PES é reconhecida como uma enfermidade de caráter crônico (Thacker & Minion, 2012).

As lesões pulmonares macroscópicas são compostas por áreas de consolidação pulmonar, geralmente em lobos apicais, cardíaco, intermediário e partes mais craniais do lobo diafragmático. Tais lesões em geral apresentam regressão total em torno de 12 ou 14 semanas após infecção deixando apenas uma cicatriz (Maes et al., 2008). As principais lesões microscópicas associadas à presença de *M. hyopneumoniae* no pulmão são broncopneumonia catarral caracterizada por grande infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no lúmen e hiperplasia de tecidos linfoides associados aos brônquios (BALTs) (Hillen et al., 2014). Outras alterações como o aumento da densidade de células produtoras de muco e espessamento do epitélio pulmonar também estão associadas a presença de *M. hyopneumoniae* no sistema respiratório de suínos (Rodríguez et al., 2016).

A análise de lavado traqueobrônquico (LTB) tem alta sensibilidade para a detecção do microrganismo, uma vez que apesar de já ter sido encontrado em outras localizações do sistema respiratório dos suínos, traqueia brônquios e bronquíolos são os sítios primário e principais de infecção (Kwon et al., 2002, Marois et al., 2007; Marois et al., 2010), apesar de ocorrerem alterações na localização do agente durante o curso da infecção. Estudo de Otagiri et al. (2005) mostrou uma concentração 100 vezes maior de *M. hyopneumoniae* em traqueias e brônquios do que na cavidade nasal, uma vez que esta última só é colonizada, por meio dos acessos de tosse, quando há grande concentração do agente nos pulmões e brônquios.

Por meio de técnicas de hibridização *in situ*, foi possível observar a presença do

material genético do agente na superfície epitelial dos brônquios, bronquíolos, pneumócitos tipo I e em macrófagos alveolares, de suínos experimentalmente infectados (Kwon & Chae, 1999). Entretanto, a presença em porções mais caudais do sistema respiratório como epitélio alveolar e macrófagos alveolares possivelmente está relacionada a curso mais avançado da enfermidade (Kwon et al., 2002). A dinâmica da colonização do sistema respiratório do suíno por *M. hyopneumoniae* ainda não está completamente elucidada.

Uma das características de *M. hyopneumoniae* é a capacidade de adesão às células epiteliais, sendo considerado um patógeno do epitélio respiratório (Razin et al., 1992). Essa localização do microrganismo causa ciliostase do epitélio respiratório (DeBey e Ross, 1994), além de alterações na estimulação da resposta inflamatória que facilitam a instalação e infecção por outros patógenos do sistema respiratório dos suínos (Maes et al., 2008). Alterações morfológicas e conformacionais, detectadas *in vitro*, em células de traqueia de suíno demonstraram a ação patogênica do agente neste sítio (Leal Zimmer et al., 2019).

Dentre as alterações na resposta inflamatória relacionadas a presença de antígenos do *M. hyopneumoniae*, podem-se citar o estímulo anormal da liberação de citocinas pró-inflamatórias, liberação de óxido nítrico e de espécies reativas do oxigênio por macrófagos, e principalmente, o estímulo à apoptose em células mononucleares de defesa (Bai et al., 2015; Liu et al., 2019)

Entretanto, exceto em casos graves, a enfermidade é caracterizada apenas pelo aparecimento de tosse e redução no ganho diário de peso (Rodríguez et al., 2016). Relato de infecção experimental aponta que em média a tosse aparece por volta do 13º dia pós infecção (dpi) nos animais e a soroconversão ocorreu apenas no 22º dpi (Sørensen et al., 1997). Outro estudo mostrou que os sinais clínicos, indicativos da fase aguda da doença, duraram até aproximadamente 80º dpi (Pieters et al., 2009). A frequência e severidade dos sinais clínicos está diretamente relacionada com diversos fatores, como a estirpe do agente, a pressão de infecção, a presença de co-infecção com outros patógenos e, principalmente, à presença de fatores de risco no ambiente de criação animal (Sibila et al., 2007).

Marois et al. (2010) constataram que, para infecções experimentais, uma concentração mínima de 10^8 células viáveis/mL foi necessária para a indução de lesões pulmonares nos animais, e nos grupos infectados com concentrações maiores (10^{12} CCU/mL), o surgimento de sinais clínicos foi mais rápido. Por outro lado, ainda não existem relatos precisos sobre a dose infectante a campo, e a virulência da estirpe de *M. hyopneumoniae* ainda é considerada o principal fator envolvido na severidade da enfermidade (Villarreal et al., 2011).

Variações na virulência entre isolados de campo já foram relatadas e classificadas em alta, moderada e baixa virulência com base na severidade dos sinais clínicos (Vicca et al., 2003). Meyns et al, (2007) relataram que estirpes com virulência moderada e alta apresentaram um crescimento *in vitro* mais acelerado, bem como, induziram uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6).

Acredita-se que a maior parte da lesão tecidual verificada na PES seja decorrente da resposta inflamatória descontrolada do hospedeiro, apesar deste mecanismo ainda não ser completamente elucidado atualmente (Thacker & Minion, 2012). Nesse sentido, suínos selecionados para terem um sistema imune menos responsivo apresentaram menores escores de lesão macroscópica pulmonar quando infectados por *M. hyopneumoniae*, em comparação a suínos não selecionados (Borjigin et al., 2016).

Suínos experimentalmente infectados apresentaram aumentos consideráveis na expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 e TNF- α em células de BALT utilizando técnica de imunohistoquímica (Lorenzo et al., 2006). Lipídeos associados à membrana de *M. hyopneumoniae* induziram a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de radicais livres como moléculas de espécies reativas do oxigênio e de óxido nítrico, que em alta concentração causaram a apoptose de células polimorfonucleares do sangue periférico dos animais (Bai et al., 2015).

Ainda, proteínas da membrana desse agente induziram menor liberação de IFN- γ em ratos quando comparado a proteínas ortólogas de outras espécies de micoplasmas apatogênicas (Leal et al., 2016). Pesquisa mais recente demonstrou que proteínas de membrana de *M. hyopneumoniae* induziram uma maior liberação da citocina anti-

inflamatória IL-10 em ratos quando comparado à proteína ortóloga de *Mycoplasma flocculare*, agente apatogênico para suínos (Leal et al., 2016). Tal achado pode estar diretamente relacionado com a capacidade do agente em modular a resposta pró-inflamatória do hospedeiro e, conseqüentemente, persistir nos tecidos e causar lesão.

Vranckx et al. (2012) sugeriram haver uma possível associação entre escores da lesão pulmonar e a concentração do agente no lavado traqueobrônquico (LTB) em suínos na fase de terminação e naturalmente infectados. Este fato sugere que a patogenia e a virulência podem estar relacionadas também com a velocidade de multiplicação do agente, e conseqüentemente, com a maior carga de microrganismos colonizando o trato respiratório do suíno em determinado momento. Já outro estudo correlacionou a presença de material genético do *M. hyopneumoniae* em brônquios e lesões pulmonares sugestivas de PES (Casalmiglia et al., 2000), porém a técnica diagnóstica utilizada (Nested PCR) não se permitiu se realizar nenhuma associação entre a extensão das lesões e a quantidade do agente colonizando o trato respiratório.

Estirpes virulentas apresentaram maior morbidade, quando comparadas a estirpes de baixa virulência, tal fato poderia estar relacionado a diferenças na velocidade de multiplicação entre estirpes, conseqüentemente, levando a uma maior população de *M. hyopneumoniae* e maior excreção para o ambiente, facilitando a transmissão (Meyns et al., 2006). Todavia, ainda não foi possível correlacionar a presença e a extensão de lesão de pulmão com a carga do *M. hyopneumoniae* colonizando os animais (Woolley et al., 2012), uma vez que alta prevalência e altas taxas de incidência da enfermidade em um rebanho não necessariamente implicam na presença e grande extensão de lesões pulmonares (Vicca et al., 2002).

A correlação entre a quantidade de *M. hyopneumoniae* colonizando as vias respiratórias e o tamanho da lesão pulmonar pode validar o uso da qPCR para predizer lesões pulmonares em animais vivos (Vranckx et al., 2012). Entretanto, existem poucas informações sobre a real influência da concentração/localização do agente nas vias respiratórias e a influência das citocinas, sobre aparecimento/extensão de lesões patogênicas, curso clínico da enfermidade e patogenicidade do agente.

3. REFERÊNCIAS

- Bai, F., Ni, B., Liu, M., Feng, Z., Xiong, Q., Shao, G., 2015. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet. Microbiol.* 175, 58–67. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.013
- Borjigin, L., Shimazu, T., Katayama, Y., Li, M., Satoh, T., Watanabe, K., Kitazawa, H., Roh, S.G., Aso, H., Katoh, K., Uchida, T., Suda, Y., Sakuma, A., Nakajo, M., Suzuki, K., 2016. Immunogenic properties of Landrace pigs selected for resistance to mycoplasma pneumonia of swine. *Anim. Sci. J.* 87, 321–329. doi:10.1111/asj.12440
- Carrijo, K.F. 2012. Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovírus suíno tipo 2 em tecidos pulmonar, renal e linfóide e de *Leptospira* spp. em suínos abatidos sob inspeção sanitária. 155f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Casalmiglia, M., Collins, J. E., Pijoan, C. 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Veterinary Microbiology* 76, 299-303.
- Casalmiglia, M., Pijoan, C. 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record* 146, 530-532.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can. Vet. J.* 44, 735–737.
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312–5318.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can. Vet. J.* 69, 223–228.
- Fablet, C., Marois-Crehan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., et al. 2012. Infectious agents associated with respiratory disease in 125 farrow-to-finish pig herds: a cross-sectional study. *Veterinary Microbiology* 157, 152-163
- Gillespie, T. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection costs in a naïve population. 2013. In: Allen D. Lemman Swine Conference. p. 51
- Haden, C., Painter, T., Fangman, T., Holtkamp, D., 2012. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. *AASV Annu. Meet.* 75–76.
- Hillen, S., Von Berg, S., Köhler, K., Reinahcer, M., Willems, H., Reiner, G. 2014. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. *Preventive Veterinary Medicine* 113, 580-588.
- Kwon, D., Chae, C. 1999. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by *In Situ* Hybridization using digoxin-labeled probe. *Veterinary Pathology* 36, 308-313.

- Kwon, D., Choi, C., Chae, C. 2002. Chronological localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology* 39, 584-587.
- Leal, F. M. A., Virginio, V. G., Martello, C. L., Paes, J. A., Borges, T. J., Jaeger, N., Bonorino, C., Ferreira, H. B. 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* differential domains from orthologous surface proteins induce distinct cellular immune response in mice. *Veterinary Microbiology* 190, 50-57.
- Lorenzo, H., Quesada, Ó., Assunção, P., Castro, A., Rodríguez, F. 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109, 199-207.
- Leal Zimmer, F.M. dos A., Paludo, G.P., Moura, H., Barr, J.R., Ferreira, H.B., 2019. Differential secretome profiling of a swine tracheal cell line infected with mycoplasmas of the swine respiratory tract. *J. Proteomics* 192, 147–159. doi:10.1016/j.jprot.2018.08.018
- Liu, W., Zhou, D., Yuan, F., Liu, Z., Duan, Z., Yang, K., Guo, R., Li, M., Li, S., Fang, L., Xiao, S., Tian, Y., 2019. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microb. Pathog.* 126, 92–100. doi:10.1016/j.micpath.2018.10.035
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 126, 297–309. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.008
- Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segalés, J., Haesebrouck, F., Pieters, M., 2018. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 110–124. doi:10.1111/tbed.12677
- Marois C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V. 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology* 120, 961-104.
- Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M. 2010. Development of a quantitative Real Time Taq-Man PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of Applied Biology* 108 (5), 1523-1533.
- Meyns, T., Dewulf, J., Kruiff, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D. 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081-7086.
- Meyns, T., Maes, D., Calus, D., Ribbens, S., Dewulf, J., Chiers, K., Kruif, A., Cox, E., Decostere, A., Haesebrouck, F. 2007. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Veterinary Microbiology* 120, 87-95.
- Otagiri, Y., Asai, T., Okada, M., Uto, T., Yazawa, S., Hirai, H., Shibata, I., Sato, S. 2005. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swabs samples from pigs by nested PCR and culture methods. *Bacteriology* 67 (8), 801-805.
- Pieters, M., Cline, G. S., Payne, B. J., Prado, C., Ertl, J. R., Rendahl, A. K. 2014. Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. *Veterinary Microbiology* 172, 575-580.
- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of

- pigs. *Vet. Microbiol.* 134, 261–266. doi:10.1016/j.vetmic.2008.08.016
- Razin, S., Jacobs, E. 1992. Mycoplasma Adhesion. *Journal of General Microbiology* 138, 407-422.
- Rottem, S. 2003. Interaction of Mycoplasmas with host cells. *Physiology Reviews* 83, 417-432.
- Rodríguez, F., Batista, M., Hernández, J.N., Afonso, A.M., Poveda, J.B., 2016. Relationship Between Expression of Interleukin-5 and Interleukin-13 by Epithelial Cells and Bronchiolar Changes in Pigs Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 154, 165–168. doi:10.1016/j.jcpa.2016.01.007
- Roos, L.R., Fano, E., Homwong, N., Payne, B., Pieters, M., 2016. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. *Vet. Microbiol.* 184, 51–58. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.008
- Ruiz, A., Utrera, V., Pijoan, C. 2003. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning age. *Journal of Swine Health and Production* 11 (3), 131-135.
- Sibila, M., Nofrarías, M., López-Soria, S., Segalés, J., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M. 2007. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Veterinary Microbiology* 121, 352-356.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J. 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *The Veterinary Journal* 181, 221-231.
- Silva, G.S., Yeske, P., Morrison, R.B., Linhares, D.C.L., 2019. Benefit-cost analysis to estimate the payback time and the economic value of two *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination methods in breeding herds. *Prev. Vet. Med.* 168, 95–102. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.04.008
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E., Pedersen, M.W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23–34. doi:10.1016/S0378-1135(96)01266-7
- Thacker, E. L., Minion, C. 2012. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 10a Ed., Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. John Wiley & Sons, Ames, EUA, pp. 779-797.
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D.E.S.N., de Lara, A.C., Kunrath, C.F., Pieters, M., 2017. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Vet. Microbiol.* 203, 215–220. doi:10.1016/j.vetmic.2017.03.025
- Tamiozzo, P. J., Pelizza, B. R., Carranza, A. I., Ambrogi. A. 2011. Monitoramento da presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em granjas de suínos durante a implementação de programas de erradicação. *Ciência Rural*, 1-7.
- Vicca, J., Maes, D., Thermote, L., Peeters, J., Haesebrouck, F. 2002. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease course. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Public Health* 49, 349-353.

- Vicca, J., Strakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., Kruif, A., Haesebrouck, F. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology* 97, 177-190.
- Vicente, A. F., Catto, D., Allendorf, S. D., Garcia, K. C. O. D., Antunes, J. A. M. P., Appolinario, C. M., Perez, M. G., Megid, J. 2013. Soropositividade para *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos abatidos em frigoríficos da região central do estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65, 1899-1903.
- Villareal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D. 2011. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *The Veterinary Journal* 188, 48-52.
- Vranckx, K., Maes, D., Sacristán, R. D. P., Pasmans, F., Haesebrouck, F. 2012. A Longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Veterinary Microbiology* 2012,315-321.
- Woolley, L.K., Fell, S., Gonsalves, J.R., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., Jenkins, C., Eamens, G.J., 2012. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet. Microbiol.* 161, 186–195. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.025

CAPÍTULO 2 - Relações entre a expressão de citocinas e a carga bacteriana no desenvolvimento de lesões anatômicas e histopatológicas pulmonares em suínos experimentalmente infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae* amostra 232

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é uma das principais bactérias envolvidas no complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS), produzindo a pneumonia enzoótica suína (PES), enfermidade de desenvolvimento classicamente crônico (Thacker & Minion, 2012; Takeuti et al., 2017). Este agente é responsável por prejuízos na suinocultura mundial em diversas frentes, mas principalmente pelas perdas produtivas, como redução no ganho de peso diário (GPD) (Pointon et al., 1985), resultante da ativação contínua do sistema imunológico e pela reação inflamatória os quais aumentam os gastos energéticos do metabolismo.

A colonização do trato respiratório pelo patógeno em animais infectados resulta principalmente em lesões de consolidação crânio-ventral, caracterizadas por coloração vermelho escura e consistência firme, localizadas em lobos apicais, cardíaco, intermediário e raramente em lobos diafragmáticos (Thacker & Minion, 2012). As lesões geralmente apresentam tendência à redução com o passar do tempo e formação de cicatrizes de aspecto acinzentado (Maes et al., 2008).

A detecção de lesões características em avaliações *post-mortem* é a principal ferramenta utilizada na prática veterinária para se detectar suspeitas da ocorrência da enfermidade e, de certa forma, estimar-se o grau de intensidade de acometimento do rebanho (Garcia-Morante et al., 2016) tanto experimentalmente quanto em rebanhos a campo. Entretanto, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos diretamente relacionados a formação de lesão. Diferenças na patogenicidade e virulência entre amostras de *M. hyopneumoniae* já foram apontadas como envolvidas na intensidade e conseqüentemente, na extensão de lesão (Meyns et al., 2007).

Por outro lado, outro fator apontado como envolvido nas lesões é a resposta imune do hospedeiro. Assim, foi verificado que *M. hyopneumoniae* é notadamente um

patógeno que apresenta capacidade de evadir da resposta imune do hospedeiro e de induzir respostas imunopatológicas (Bai et al., 2013, Bai et al., 2015) e dessa forma produzir infecções persistentes que podem durar até 256 dias (Pieters et al., 2009).

Acredita-se que essa estimulação contínua do sistema imune do hospedeiro seria a raiz das respostas exageradas que resultam em lesões de maior intensidade e conseqüentemente de maior impacto na saúde do hospedeiro (Thacker & Minion, 2012). Substâncias promotoras e reguladoras da inflamação como citocinas e quimiocinas quando liberadas em demasia e de forma contínua podem resultar em dano tecidual entre outras ações deletérias o para organismo do hospedeiro (Devries et al., 1999).

Infecções por *M. hyopneumoniae* em cultivo celular de macrófagos alveolares induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias (Hwang et al., 2011). Apesar de serem poucos os estudos sobre correlações *in vivo* dessas citocinas com o processo patológico de formação de lesão, sabe-se que elas estão diretamente relacionadas com a patofisiologia da formação de lesões pulmonares (Ahn et al., 2009).

Por outro lado, pouco se sabe sobre os principais mecanismos ativados do sistema imune no sistema respiratório e como poderiam estar envolvidos na formação de lesão e no combate à infecção por *M. hyopneumoniae*. Os níveis séricos de anticorpos do isótipo IgG2 contra essa bactéria já foram correlacionados *in vivo* com a presença de lesões de consolidação crânio-ventral em animais, indicando o possível envolvimento de linfócitos Th2 no desenvolvimento dessas lesões pulmonares (Fraile et al., 2010).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar os principais fatores imunológicos e da carga bacteriana envolvidos na formação de lesão de consolidação crânio-ventral e histopatológica no pulmão de suínos experimentalmente infectados por *M. hyopneumoniae*, amostra 232, em quatro momentos diferentes pós-infecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento e infecção experimental

Um total de 24 suínos da raça Large White, com aproximadamente 28 dias de idade, provenientes de uma fazenda livre de *M. hyopneumoniae*, foram utilizados nesse estudo. Os animais foram convenientemente separados em grupos controle (n=8) e infectados (n=18), alojados em instalações diferentes, visando mitigar problemas de biossegurança durante o período experimental.

Os animais foram alojados em baias com acesso livre a água e alimentados duas vezes ao dia com ração. Após a chegada os suínos passaram por sete dias de adaptação nas instalações, momento em que foram colhidos suabes nasais e amostras de sangue, com o objetivo de se assegurar o status de livre de infecção por *M. hyopneumoniae*. Todos os animais foram negativos tanto na qPCR para detecção do agente como para a presença de anticorpos (IgG) no ELISA, e considerados aptos para utilização no estudo.

No dia da infecção (dpi 0), os animais foram inoculados com 10 mL de meio Friis esterilizado (grupo controle) ou 10 mL de macerado de pulmão de suíno experimentalmente infectado por *M. hyopneumoniae* amostra 232 patogênica (10^6 CCU/mL) (grupo infectado) cedido pela Iowa State University (Ames - IA, EUA) e diluído em meio Friis. A infecção foi induzida por via intratraqueal de acordo com o padrão recomendado pela literatura para infecções experimentais (Garcia-Morante et al., 2016). Neste procedimento os animais foram contidos, e com o auxílio de um laringoscópio, o cateter foi inserido na traqueia. Em seguida 10 mL do meio puro ou do inóculo foram instilados pela sonda utilizando-se seringa descartável e essa foi em seguida lavada com 10mL de solução fisiológica.

2.2. Eutanásia e Necropsia

A cada 14 dias dois animais do grupo controle e quatro do grupo infectado eram aleatoriamente escolhidos, eutanasiados e necropsiados. Para eutanásia foram

utilizados dose intramuscular de Xilazaina 1mg/Kg, 10 mL de Cloreto de potássio (KCl) intracardíaco seguida de sangria do animal. Após constatada a morte, a necrópsia foi realizada, momento em que se avaliou o escore de lesão pulmonar e foram colhidas amostras para posterior análise. Neste experimento foram analisadas amostras colhidas nos intervalos de 14, 28, 42 e 56 dpi.

Este trabalho foi submetido a Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da FCAV Unesp Câmpus Jaboticabal e aprovado com o número de protocolo 9.952/16.

2.3. *Exame físico*

Após a infecção, os animais foram examinados a cada três dias, momento em que foi feito exame físico e a temperatura foi aferida. Semanalmente foram colhidas amostras de sangue de todos animais, e os mesmos foram pesados em balança para cálculo de ganho de peso diário. O cálculo do ganho de peso diário (GPD) foi realizado subtraindo-se o peso inicial dos animais do peso final, e dividindo-se a diferença pelo número de dias em que o animal analisado esteve no experimento. Todos os grupos foram alimentados com a mesma ração e alojados em instalações com condições semelhantes.

2.4. *Sorologia*

Amostras de sangue de cada animal foram colhidas por punção jugular utilizando-se sistema à vácuo fechado (Vacutainer, BD - EUA). Em seguida, o sangue foi centrifugado 8.000g por 15 minutos e 1mL de plasma foi colhido e armazenado em microtubos (Axygen, EUA) a -20°C até o uso.

A detecção de anticorpos (IgG) anti-*M. hyopneumoniae* no soro dos animais foi realizada utilizando-se kit de ELISA indireto *M. hyo.* Ab test (IDEXX, EUA). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro iMARK (Biorad, EUA) no comprimento de onda de 650 nm. O cálculo do valor S/P foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Como os animais foram experimentalmente infectados e mantidos em instalações

isoladas, resultados suspeitos (S/P entre 0,3 e 0,4) foram consideradas positivas as amostras com valor de S/P maior que 0,3 ao invés de 0,4 como preconizado pelo fabricante.

2.5. *Avaliação post-mortem do escore de lesão pulmonar macroscópica*

A partir do 14^o dpi e a cada intervalo de 14 dias, até o 56^o dpi, dois animais do grupo controle e quatro do grupo infectado foram aleatoriamente escolhidos, eutanasiados e submetidos a necropsia. Durante a necropsia, os pulmões foram separados e realizou-se a avaliação do escore de lesões macroscópicas associadas a pneumonia por *M. hyopneumoniae*. Foram consideradas lesões de consolidação em lobos crânio-ventrais (lobo apical, lobo cardíaco e lobo acessório) dos pulmões, sendo que qualquer outro tipo de alteração não foi considerado nessa avaliação. A classificação do escore foi realizada de acordo com o método previamente descrito (Straw et al., 1986). Em suma, cada um dos lobos pulmonares foi avaliado macroscopicamente e a porcentagem de área de superfície acometida por lesões foi estimada e, em seguida, multiplicada pelo peso que cada lobo pulmonar representava da área de superfície total.

2.6. *Colheita de fragmentos de pulmão para histopatologia*

Durante a necropsia, fragmentos de pulmão (com e sem lesão) foram colhidos para determinação do escore de lesão microscópica. Os fragmentos colhidos foram armazenados em formalina tamponada a 10%. Caso não houvesse lesões, foram colhidos fragmentos dos lobos strawapicais, médios e acessório. As amostras de pulmão foram submetidas ao procedimento padrão para exame histopatológico, sendo coradas com Hematoxilina- Eosina (HE) e as lâminas obtidas foram analisadas em microscópio de luz.

O escore das lesões microscópicas foi determinado de acordo com o estabelecido por Livingston et al. (1972). Em síntese, a metodologia consistiu em adotar uma escala baseada em lesões características e não características de infecção por *M.*

hyopneumoniae. Brevemente, a escala varia de 0 a 4, onde: 0 = ausência de lesão; 1 = lesões de pneumonia intersticial e/ou broncopneumonia catarral; 2 = presença de infiltração leve ou moderada de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nas vias aéreas e alvéolos; 3 = Hiperplasia linfoplasmocítica perivascular ou peribroquiolar, hiperplasia de pneumócitos tipo II e presença de edema nos alvéolos e 4 = as mesmas lesões do escore 3 mais a presença de nódulos linfoides perivascular e peribronquiolar. As lesões de escores 1 e 2 foram consideradas inespecíficas, enquanto as lesões 3 e 4 foram consideradas específicas de PES.

2.7. *Colheita de amostras biológicas de pulmão*

Fragmentos das lesões de consolidação localizadas em lobos crânio-ventrais do pulmão foram colhidos utilizando-se bisturi e lâminas esterilizadas, sendo acondicionados em criotubos livres de pirógenos e ribonucleases (Corning, EUA), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até o uso. Animais com mais de uma lesão de consolidação, foram colheram-se fragmentos de todas as lesões, animais sem lesões (controle), fragmentos de todos lobos apicais e acessório foram colhidos.

2.8. *Extração de DNA*

Para a extração do DNA das amostras de pulmão foi realizado um protocolo de extração *in house* (Kuramae-Izioka, 1997). Em resumo, 0,5g de amostra de pulmão foram misturados a 600 µL de tampão de lise (160 mM de solução de Tris-HCl pH 8,0; 60 mM de EDTA (pH 8,0) (Sigma-Aldrich, EUA); 20mM de NaCl (Êxodo Científica, Brasil); 0,5% SDS (Sigma- Aldrich, EUA) e 0,5% de PVP (Sigma-Aldrich, EUA) acrescentado de 1,6 µL de 2 – Mercaptoetanol (Sigma Aldrich, EUA), agitado em vórtex e incubado em banho seco por 65°C por 40 minutos. Terminada a incubação, acrescentou-se 250 µL de Acetato de potássio (Sigma-Aldrich, EUA), 5M, em cada amostra e foi realizada nova incubação em gelo por 30 minutos, agitando-se por inversão a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R,

Eppendorf, Alemanha) a 4°C por 10 minutos a 13.000 g.

Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e passado para outro tubo, onde se acrescentou-se 550 µL de solução de Clorofórmio (Merck, Alemanha) e álcool Isoamílico (24:1) (Acros Organics, EUA), seguindo-se de agitação em vórtex e centrifugação a 4°C, 13.000g por 10 minutos. O sobrenadante então foi novamente coletado e passado a outro tubo com 1 mL de álcool absoluto (Emsure®, Merck – Alemanha) e misturado por inversão. As amostras foram incubadas *overnight* (16 horas) em freezer -20°C para precipitação do DNA.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10°C por 20 minutos a 13.000g e em seguida descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se 1mL de solução de álcool 70% (Emsure®, Merck – Alemanha). Agitou-se então suavemente o tubo para ressuspender o precipitado formado no fundo do microtubo. Procedeu-se nova centrifugação (10°C por 20 minutos a 13.000g). Ao final, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dessecado a 55°C por duas horas em estufa. Terminada a secagem acrescentaram-se 70 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM de EDTA) e, em seguida, a suspensão foi incubada a 4°C por quatro horas. Terminada a eluição o sobrenadante foi colhido e colocado em tubos de 200 µL livres de DNase e RNase (Axygen, EUA). A quantificação da concentração do DNA extraído foi por espectrofotometria (Nanodrop®, Thermo Fisher- EUA). Por fim, as amostras de DNA foram estocadas a -20°C até o uso.

2.9. *Teste da presença de inibidores no DNA extraído*

Procedeu-se a checagem quanto a presença de inibidores na solução de DNA extraído através de técnica de PCR convencional para detecção do gene endógeno do Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*gapdh*), de acordo com o protocolo já publicado Birkenheuer et al. (2003) . Somente foram utilizadas para a qPCR amostras em que houvesse amplificação do referido gene. Amostras negativas na PCR para o gene *gapdh* foram submetidas novamente a extração de DNA. A reação foi composta por: 0,5 µM de cada um dos iniciadores (Forward: 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3' e Reverse 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') (Invitrogen, EUA), 1 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA), solução tampão 1X (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen,

EUA), 1mM de dNTP mix (Invitrogen, EUA), água ultrapura q.s.p. para 19 µL e 1 µL de DNA template, totalizando-se 20 µL. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes configurações: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C, seguido de 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto e mais uma extensão final de 5 minutos em termociclador MyCycler (Bio Rad, EUA). Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich, EUA) corado com 0,1% de Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich, EUA). O gel era lido em transiluminador ChemiDoc MP (Bio Rad, EUA). O tamanho esperado do fragmento amplificado era de 437 bp.

2.10. Detecção e quantificação de cópias de DNA do gene codificador da proteína P102 de *M. hyopneumoniae*

Para se detectar a presença e estimar a quantidade de *M. hyopneumoniae* em fragmentos de pulmão, foi utilizada a técnica de quantificação absoluta por qPCR. As amostras de pulmão foram processadas em duplicatas e o ensaio utilizado foi otimizado a partir do protocolo já descrito por Fourour et al. (2018). Os iniciadores e a sonda de hidrólise utilizados na reação possuem como alvo o gene multicópia codificador da proteína de adesão p102 dessa bactéria (GenBank: AE017332.1). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores foram analisadas *in silico* utilizando-se a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e não apresentaram similaridade com material genético de outros patógenos de suínos. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores *sense* e *anti-sense* e da sonda de hidrólise (Fourour et al., 2018), estão apresentados abaixo:

Primer *sense*: 5'-TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC-3'

Primer *anti-sense*: 5'- AAATTAAGCTGTTCAAATGC-3'

Sonda de hidrólise 5'- FAM-AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-§BHQ2-3'

A reação foi composta por 1X de Master mix Go taq® (Promega, Madison, EUA), 0,5 µM de cada primer (Invitrogen, EUA), 0,3 µM da sonda de hidrólise (IDT, Iowa City-EUA), água ultrapura q.s.p e 1 µL de DNA template por amostra totalizando 10 µL de reação. A qPCR foi realizada em termociclador de tempo real CFX-96 (Biorad - EUA) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 55,7 °C por 1 minuto. As amostras foram testadas em duplicata e os resultados só foram aceitos para amostras com desvio padrão menor de 0,5 ciclo (Bustin et al., 2009). Caso a diferença fosse maior, as amostras foram testadas novamente em triplicatas.

2.10.1. Quantificação absoluta de fragmentos do gene P102 de M. hyopneumoniae

A quantificação absoluta foi realizada utilizando-se curva padrão com diluições seriadas de razão constante igual a 10, iniciando-se em 10⁻¹ até 10⁻⁷. Para isto utilizou-se DNA sintético (GBlock®, IDT, Iowa City, IA, EUA) contendo o fragmento de 150 pb a ser amplificado pelo par de iniciadores apresentado anteriormente. O DNA sintético foi diluído conforme as orientações do fabricante e mantido em concentração estoque de 10⁷ moléculas/µL. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas utilizando-se 45µL de tampão Tris-EDTA (TE 24:1) e 5 µL de solução a 10⁷ do DNA sintético. Os dados de quantificação foram utilizados somente se a eficiência obtida estivesse entre 90% e 105% (Bustin et al., 2009) .

2.11. Extração de RNA

A extração do RNA das amostras de lesões pulmonares foi realizada utilizando-se o kit RNeasy Blood and Tissue Plus (Qiagen, EUA), seguindo-se a orientação do fabricante. Foram utilizados na extração 0,05g de material de lesão pulmonar de cada amostra colhida. O RNA extraído foi posteriormente quantificado e teve sua integridade aferida utilizando-se equipamento Bioanalyzer® (Thermo Scientific, EUA) e foi imediatamente estocado a -80° C até o uso. Foram utilizadas apenas amostras que

apresentaram valor de integridade do RNA (RIN) acima de 7.

2.12. Síntese de cDNA (RT-PCR)

A síntese de cDNA foi realizada pela reação de transcrição reversa utilizando-se o kit comercial Superscript IV First Strand Synthesis (Thermo Fisher, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, foram adicionados 500 ng de RNA por reação e utilizou-se o Oligo d(T)₂₀, que possui como alvo específico a cauda poli-A do mRNA, para o anelamento. As reações foram todas realizadas em termociclador MyCycler (Bio Rad, EUA). O cDNA produzido foi quantificado por espectrofotometria (Denovix, EUA) e armazenado a -20°C até o uso para reação de qPCR. Após produzido, o cDNA foi diluído na proporção 1:4 e utilizado na qPCR para avaliação da expressão dos genes codificadores de citocinas no pulmão e o possível envolvimento com a lesão pulmonar.

2.13. Expressão dos genes codificadores de citocinas em amostras de pulmão

2.13.1. Seleção dos genes de referência

Para normalizar a expressão dos genes alvo, foram selecionados cinco genes candidatos a referência em suínos: Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase (*gapdh*), Hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (*hprt-1*), β -Actina (*actb*), Proteína ribossômica L4 (*rpl-4*), Proteína de ativação da Tirosina 3-Monooxigenase/Triptofano 5-Monooxigenase polipeptídeo Zeta (*ywzah*).

Cada um dos genes teve sua expressão quantificada por qPCR com pares de iniciadores específicos. A sequência dos iniciadores dos genes *gapdh*, *rpl-4* e *hprt-1* foi retirada de protocolos previamente publicados (Nygard et al., 2007; Okino et al., 2018), enquanto os outros dois (*actb* e *ywzah*) foram desenhados com base nas sequências de referência depositadas no GenBank e utilizando-se o software Primer3 (Untergasser et al., 2012), priorizando-se as sequências de iniciadores sense ou anti-sense localizados na junção Exon-Exon evitando-se amplificação de DNA genômico.

Os candidatos a genes de referência tiveram sua expressão aferida nas amostras de animais controle e infectados de todos os tratamentos (grupos). Os dados dos ciclos de quantificação (Cqs) obtidos foram analisados *in silico* pelo programa NormFinder (Andersen et al., 2004), e o gene com a maior estabilidade nas amostras foi selecionado para a normalização dos genes alvo.

2.13.2. Quantificação do mRNA (qPCR)

A expressão dos genes codificadores de citocinas foi realizada por quantificação relativa utilizando-se a técnica de qPCR a partir de amostras de cDNA obtidas na técnica de RT realizada com as preparações de RNA extraídas das amostras de pulmão. Iniciadores específicos tendo como alvo os genes codificadores das citocinas Interleucina-1 α (IL-1 α), Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-10 (IL-10), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (INF- γ) foram delineados com base nas sequências de referência depositadas no GenBank utilizando-se o software Primer3 (Untergasser et al., 2012) e compreendendo a junção Exon-Exon. Os dados dos mesmos podem ser encontrados na tabela 1.

2.13.3. qPCR

As reações foram realizadas em termociclador em tempo-real CFX 96 (Bio Rad, EUA) utilizando-se o master mix Quantitect[®] Sybr Green (Qiagen, EUA) e 1 μ L de cDNA template, totalizando-se 10 μ L de reação. A especificidade dos produtos amplificados foi atestada pela curva de dissociação obtida ao fim da reação de qPCR, sendo que a variação aceita foi de \pm 0,5°C. As sequências dos iniciadores, temperatura de anelamento, número de acesso no GenBank das sequências de referência, tamanho do amplicon produzido e a temperatura de dissociação deste, podem ser encontrados na tabela 1.

A eficiência de cada reação foi aferida realizando-se curva padrão de diluições seriadas de controle positivo contendo o amplicon alvo (Gblock[®], IDT, EUA), iniciando-

se em 10^7 cópias/ μL até 10^1 cópias/ μL . Só foram utilizados dados provenientes de reações com eficiência entre 90% e 105% (Bustin et al., 2009).

A normalização da expressão dos genes de citocinas foi realizada pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Para se atender aos pressupostos deste método só foram utilizados resultados de reações em que a eficiência ficou próxima a 100% com diferença máxima aceitável de 5% entre elas. Os valores de eficiência de cada reação, bem como de R^2 e intercepção com o eixo-y estão mostrados na tabela 2.

2.14. *Análise estatística*

A normalidade dos dados e dos resíduos foi aferida utilizando-se o teste de Shapiro-Wilkins e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett (ambos $p < 0,05$). Diferenças significativas de dados paramétricos entre os grupos foi aferida utilizando-se ANOVA bicaudal e as comparações múltiplas utilizando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Para dados não-paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para se detectar diferenças entre grupos de dados e o teste de Dunn ($p < 0,05$) para comparações múltiplas. As correlações foram detectadas através da correlação de Pearson (dados paramétricos) e correlação de Spearman (dados não-paramétricos), ambos com $p < 0,05$. Os dados outliers e valores influentes foram detectados por meio dos diagnósticos de Cook e distância de Leverage, sendo posteriormente removidos das análises. Os cálculos citados foram realizados no software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o programa Graphpad Prism 6 (La Jolla, CA-EUA).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores a serem utilizados para a análise de expressão gênica das citocinas por meio da qPCR e os respectivos tamanho e temperatura de dissociação.

<i>Gene</i>	<i>Sequência de nucleotídeos (5'-3')</i>	<i>Número de acesso GenBank</i>	<i>Tamanho do amplicon (bp)</i>	<i>Temperatura de dissociação do amplicon</i>
IL-1 α	(F)GGATGAGGCAGTCAAATTTG (R)CTTTGATGGTTTTGGGTGTC	NM_214029.1	164	79,5° C
IL-1 β	(F)TTGAAGAAGAGCCCATCATC (R)GGTCACAGGTATCTTGTGT	NM_214055.1	230	81,5° C
IL-6	(F) TGGGTTCAATCAGGAGACCT (R) TGGTGGCTTTGTCTGGATTC	NM_214399.1	185	81,5° C
IL-8	(F)AGGAAAAGTGGGTGCAGAAG (R)CAACCCTATGTCTGACCAGC	NM_213867.1	190	78° C
IL-10	(F)CTTTAGCAAGCTCCAAGAGA (R)ACCTTGGAGCAGATTTTGAA	NM_214041.1	201	78° C
TNF- α	(F)AAGGACTCAGATCATCGTCT (R)TGGGAGTAGATGAGGTACAG	NM_214022.1	184	84° C
IFN- γ	(F)ATTGGAAAGAGGAGAGTGAC (R)CATTCAGTTTCCCAGAGCTA	NM_213948.1	168	76,5° C
<i>β-actina*</i>	(F)ACTCCATCATGAAGTGCGAC (R) TTGATCTTCATCGTGCTGGG	DQ845171.1	145	85° C
<i>gapdh*</i>	(F)TCCTGGGCTACACTGAGGAC (R)ACCAGGAAATGAGCTTGACG	NM_001206359.1	123	81° C
<i>rpl-4*</i>	(F) CAAGAGTAACTACAACCTTC (R) GAACTCTACGATGAATCTTC	NC_010443.5	122	75° C
<i>ywhaz*</i>	(F)TGATGATAAGAAAGGGATTGTGG (R)GTTTCAGCAATGGCTTCATCA	NM_001315726.1	203	78,5° C
<i>hprt-1*</i>	(F)GGCTATAGACCAGACTTTGTTG (R) GGACTCCAGATGTTTCCAAA	NM_001032376.2	180	77° C

* Genes de referência a serem utilizados para normalização da expressão. (F) - Iniciador Forward; (R) - Iniciador Reverse.

3. RESULTADOS

3.1. Detecção de IgG anti-*M. hyopneumoniae* no soro dos animais

Todos os animais foram negativos para a presença de anticorpos anti-*M. hyopneumoniae* no período de -7 dpi a 0 dpi. Todas as amostras do grupo controle foram negativas até o fim do experimento. Três animais do eutanasiados aos 14dpi não soroconverteram, entretanto como esses animais tiveram resultados positivos na qPCR, eles não foram excluídos do estudo. A soroconversão dos animais infectados não foi uniforme, sendo que oito animais (50%) apresentaram soroconversão aos 14dpi, três (19%) aos 28 dpi e dois (12%) aos 35 dpi.

3.2. Escore de lesões macroscópicas e microscópicas

Durante a necropsia, os pulmões dos animais foram retirados e os escores de lesão pulmonar foram avaliados de acordo com a metodologia de Straw et al. (1986). Foram consideradas neste estudo apenas lesões de consolidação crânio-ventral, compatíveis com a infecção por *M. hyopneumoniae*. As médias de área de lesão obtidas em cada intervalo pós-infecção foram 18,45% para 14 dpi; 15,84% para 28 dpi; 7,0% para 42 dpi e 6,25% para 56 dpi. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os intervalos de 14 e 28 dpi e os intervalos de 42 e 56 dpi. Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 e 2A. Lesões cicatriciais e áreas cinzentas tipo “*Fish flesh*” foram notadas em pulmões dos animais colhidos aos 42 e 56 dpi.

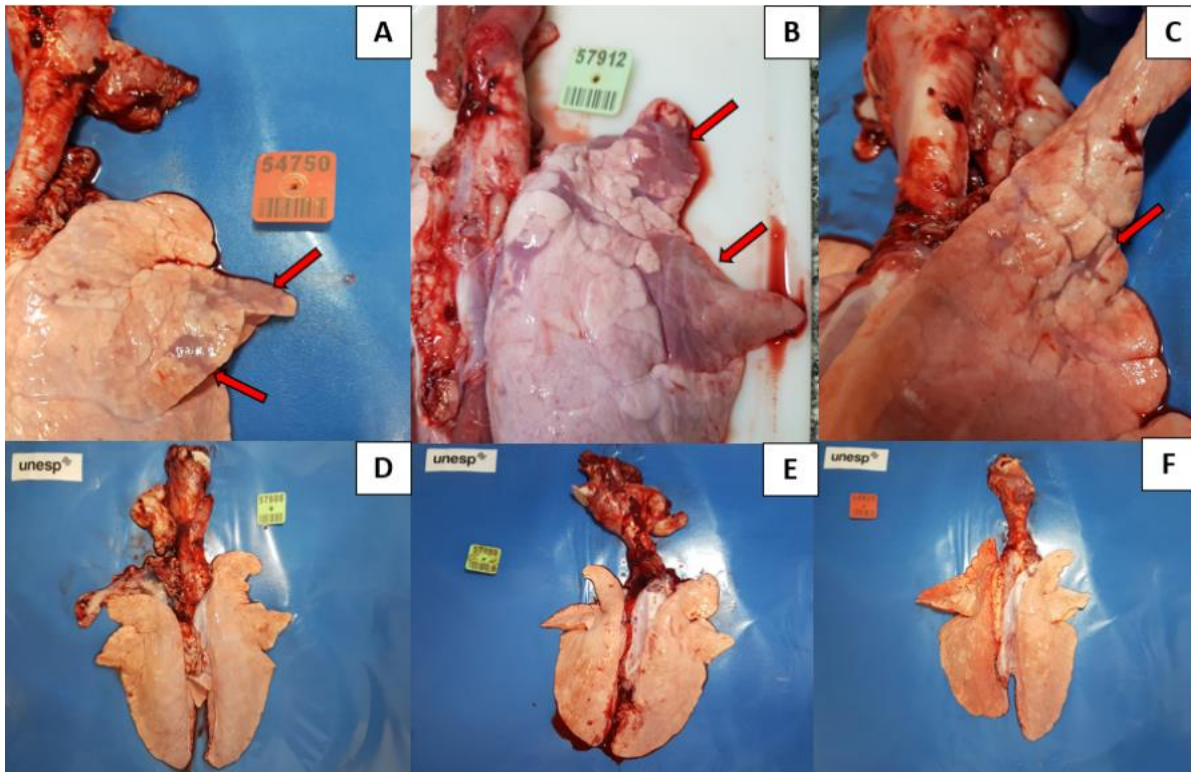


Figura 1. A – Lesão de consolidação crânio-ventral em fase inicial em lobo cardíaco direito. B- Lesão de consolidação crânio-ventral severa em lobo apical e cardíaco direito. C – Lesão em fase de regressão em lobo apical direito. D, E, F – Pulmões sem lesões de consolidação crânio ventral de animais não infectados.

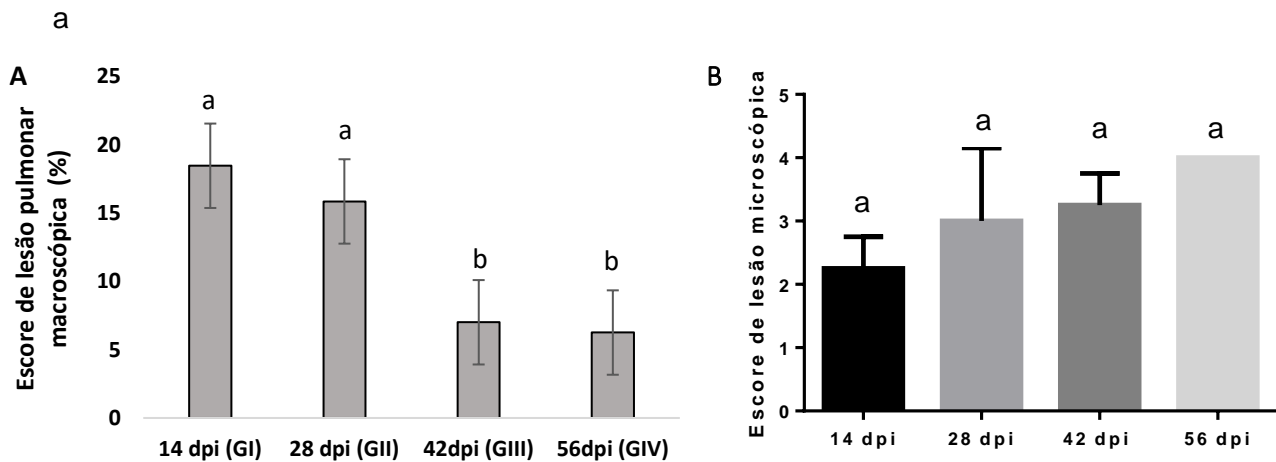


Figura 2. A- Gráfico de barras das médias dos escores de lesão de consolidação pulmonar média dos quatro grupos dos animais infectados por *M. hyopneumoniae* amostra 232: 14dpi, 28dpi, 42dpi, 56dpi. *Letras diferentes mostram diferença significativa no Teste de Tukey ($p < 0,05$). B- Gráfico de barras com a média do escore de lesão microscópica e desvio padrão dos animais infectados por intervalo.

Com relação às lesões microscópicas, foi possível observar que o escore médio de lesão microscópica dos animais controle foi de 1,12 ($\pm 0,66$) enquanto que dos animais infectados foi de 3,18 ($\pm 0,71$). Já, com respeito aos intervalos pós-infecção, os escores médios foram: 14 dpi- 2,25 ($\pm 0,38$); 28 dpi- 3,25 ($\pm 0,8$); 42 dpi - 3,25 ($\pm 0,38$); 56 dpi- 4,0 ($\pm 0,0$). A Figura 2B mostra a distribuição dos escores de lesão microscópica em função dos diferentes intervalos pós-infecção analisados. Houve diferença significativa quando se comparou o escore dos animais não infectados com os infectados, entretanto não foram detectadas diferenças entre os escores do 14 dpi, 28 dpi, 42 dpi e 56 dpi no grupo infectado.

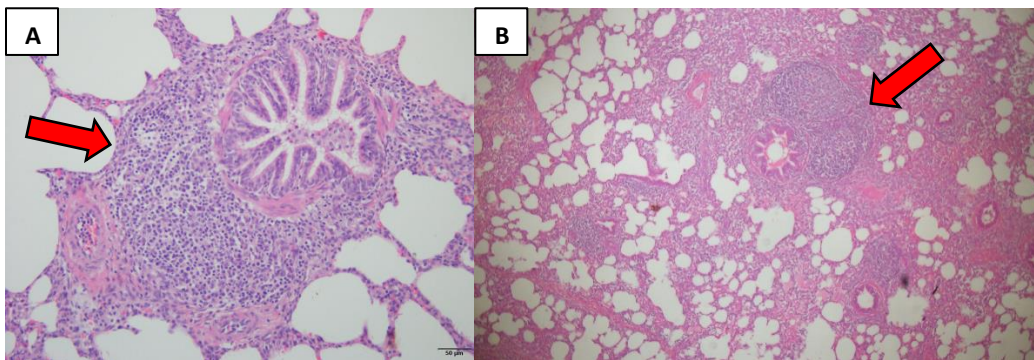


Figura 3. Lesões microscópicas características (escore 4) de infecção por *M. hyopneumoniae*. A – Broncopneumonia com hiperplasia de BALT (seta). B- Hiperplasia de BALT e pneumonia intersticial.

3.3. Detecção e quantificação de fragmento do gene *p102* de *M. hyopneumoniae* em amostras de lesão pulmonar

A eficiência das reações de qPCR variaram de 92% a 98,3%, a variação de R^2 foi de 0,996-1,0; e inclinação da reta (slope) variou de -3,36 a -3,5. As amostras de pulmão dos animais controle de todos os grupos foram negativas na qPCR para detecção do *M. hyopneumoniae*. Quanto aos animais infectados, as médias de estimativas de cópias do gene da proteína P102 foram: $1,5 \times 10^3$ (14 dpi); $8,4 \times 10^3$ (28 dpi); $3,2 \times 10^4$ (42 dpi); 1,1

x 10⁵ (56 dpi). Diferença significativa foi detectada entre a quantificação média dos fragmentos do gene da proteína P102 da bactéria aos 56 dpi com relação a quantificação detectadas aos 14 e 28 dpi, mas não com relação ao 42 dpi. A Figura 4 mostra a quantificação do número médio de cópias do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* em cada um dos intervalos pós-infecção.

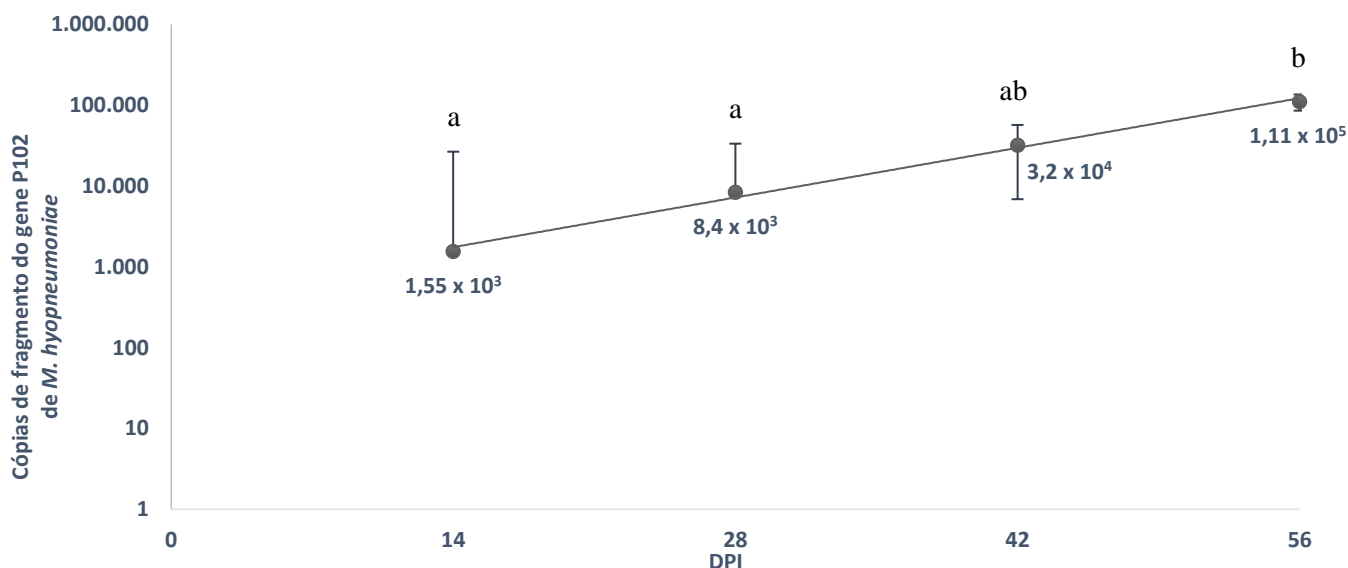


Figura 4. Gráfico com médias dos números de cópias de fragmento do gene P102 de *M. hyopneumoniae* amostra 232 (média ± d.p.) em fragmentos de lesão de pulmão nos diferentes intervalos pós-infecção.

3.4. Correlações entre os escores de lesão macroscópica, microscópica, tempo de infecção e estimativas do agente nas lesões pulmonares.

Foi detectada correlação significativa moderada e inversa (-0,64; p<0,05) entre as variáveis área de lesão macroscópica com os intervalos de tempo pós-infecção, indicando que houve tendência temporal de diminuição da área média de lesão macroscópica pulmonar com o avançar do tempo pós-infecção.

Outras correlações significativas foram detectadas entre o escore de lesão microscópica e o tempo de infecção (0,64; p<0,05), e da estimativa de cópias de fragmentos do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* em pulmão com escore de lesão microscópica (0,59; p<0,05), e com o tempo de infecção (0,65; p<0,05). Não houve

correlação significativa entre o escore de lesão microscópica e a área de lesão macroscópica, e nem entre a estimativa de cópias de fragmento do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* e a área de lesão macroscópica.

3.5. Seleção do gene de referência

A análise utilizando-se o software Normfinder (Andersen et al., 2004) indicou o gene *rpl-4* como o de maior estabilidade nas amostras. Os valores de estabilidade de todos os candidatos a genes de referência foram *gapdh*: 0,013; *actb*: 0,013; *ywzah*: 0,015; *hprt-1*: 0,019 e *rpl-4*: 0,010. Sendo assim, o gene *RPL-4* foi selecionado como o normalizador da expressão dos genes alvo. Os dados de eficiência, R2 e y-intercepto estão colocados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Resultados de eficiência, coeficiente de determinação (R2), y-intercepto e inclinação dos ensaios de qPCR utilizados para quantificação da expressão dos genes alvo e seleção do gene de referência.

Gene	Eficiência	R2	Y-intercepto	Inclinação
<i>ywzah</i>	91,2	1	38,76	-3,32
<i>hprt-1</i>	98,1	0,987	38,53	-3,55
<i>actb</i>	101,7	0,985	35,7	-3,36
<i>gapdh</i>	101,4	0,997	35,53	-3,28
<i>rpl-4</i>	100	0,988	39,01	-3,29
<i>IL-1A</i>	95,8	0,988	40,64	-3,44
<i>IL-1B</i>	102,5	0,994	35,71	-3,26
<i>IL-6</i>	98,3	0,985	37,77	-3,36
<i>IL-8</i>	98,2	0,989	39,61	-3,35
<i>IL-10</i>	95,8	0,991	38,17	-3,44
<i>TNF-A</i>	94,6	0,995	38,97	-3,45
<i>INF-G</i>	100,1	0,982	39,59	-3,3

3.6. *Expressão dos genes codificadores de citocinas*

Atendendo-se os pressupostos para o uso do cálculo estabelecido por Livak e Schmittgen (2003), só foram analisados por esse método dados provenientes de reação de qPCR com eficiência próxima a 100% e variando um máximo de 5% entre elas. Os dados de eficiência, R², y-intercepto e Inclinação das reações de qPCR para quantificação a expressão dos genes de citocinas podem ser encontrados na tabela 3.

- *IL-1 α*

A expressão do gene da IL-1 α mostrou-se aumentada aos 14 dpi, enquanto nos intervalos de 28 dpi, 42 dpi e 56 dpi, a expressão foi suprimida gradualmente, fato comprovado por correlação negativa (-0,69) e significativa entre a expressão do gene IL-1 α e o tempo pós-infecção. Ainda, diferença significativa foi encontrada entre a expressão desse mesmo gene aos 14 dpi e aos 42 dpi e 56 dpi.

- *IL-1 β*

Com relação a IL-1 β , o gene codificador apresentou expressão aumentada na maioria dos intervalos pós-infecção avaliados, exceto aos 42 dpi, em que houve uma redução seguida de posterior aumento no intervalo de 56 dpi, porém não houve diferença significativa na expressão desse gene entre os intervalos pós-infecção investigados e nem correlação com o tempo pós-infecção.

- *IL-6*

A expressão do gene da IL-6 mostrou-se aumentada aos 14 dpi e em seguida apresentou-se suprimida nos outros intervalos pós-infecção (28dpi, 42 dpi e 56 dpi) e houve diferença significativa da expressão do gene IL-6 detectada aos 14 dpi com as expressões desse mesmo gene nos intervalos de 42 dpi e 56 dpi.

- *IL-8*

O gene IL-8 mostrou-se mais expresso em todos os intervalos pós-infecção analisados neste experimento, mas não houve diferença significativa entre os níveis de expressão desse gene entre os diferentes intervalos pós-infecção.

- *IL-10*

O gene da IL-10 teve a expressão suprimida em todos os intervalos pós-infecção analisados e não houve diferença significativa entre esses intervalos.

- *INF- γ*

O gene do INF- γ por sua vez, mostrou-se levemente expresso nos intervalos de 14 dpi, 28 dpi e 42 dpi e supressão na sua expressão foi detectada no intervalo de 56 dpi, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os intervalos pós-infecção e nem correlação com o tempo de infecção.

- *TNF- α*

Por fim, o gene do TNF- α apresentou expressão aumentada apenas aos 14 dpi, tendo sua expressão suprimida nos intervalos de 28 dpi, 42 dpi e 56 dpi, sendo que diferenças significativas na expressão do gene de TNF- α foram encontradas entre os intervalos de 14 dpi com 28 dpi e 56 dpi.

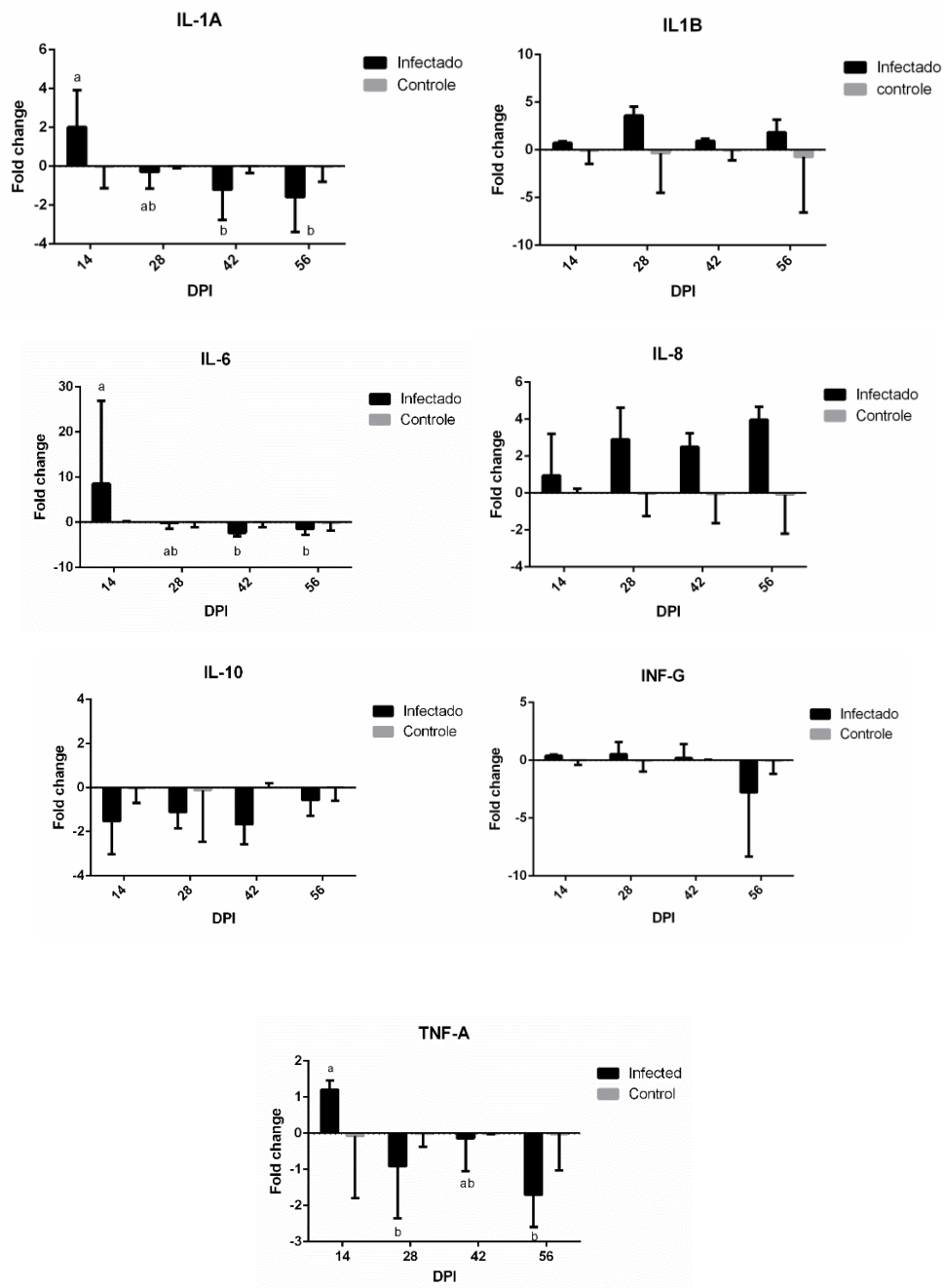


Figura 5. Gráficos representando a expressão dos genes codificadores de citocinas (média de “Fold Changes” \pm d.p.) em amostras de lesão de pulmão de suínos experimentalmente infectados por *M. hyopneumoniae* amostra 232 em quatro momentos diferentes da infecção (14 dpi, 28 dpi, 42 dpi e 56 dpi). A expressão dos genes foi normalizada utilizando-se gene de referência *rpl-4*. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os intervalos pós-infecção pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.7. Avaliação do Ganho de Peso Diário (GPD)

Os animais do grupo controle apresentaram uma média de GPD de 0,45 kg/dia, enquanto que os animais infectados tiveram uma média de GPD de 0,37 kg/dia, sendo que houve diferença significativa entre os valores de GPD médio obtidos entre os grupos infectados e controle. A Figura 6 apresenta gráfico de barras com o valor médio de GPD de animais controle e infectado em cada um dos intervalos.

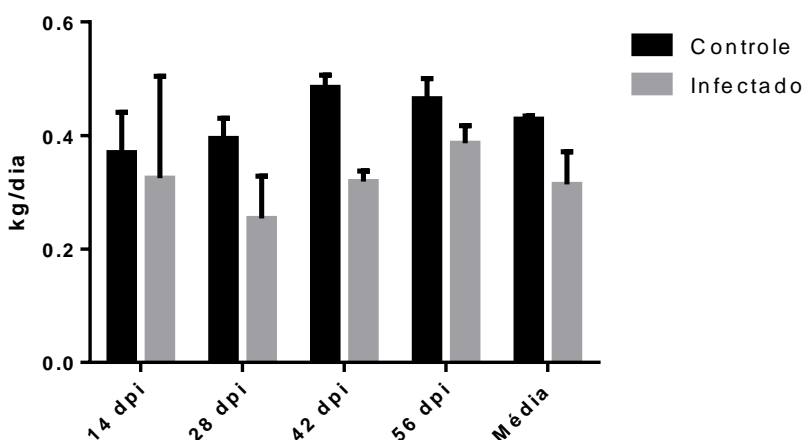


Figura 6. Gráfico de barras contendo a média e desvio padrão de GPD dos grupos controle e infectado em cada um dos intervalos analisados neste estudo.

3.8. Correlações com a expressão de genes codificadores de citocinas

A expressão do gene da IL-1 α foi correlacionada com as variáveis GPD (-0,57; $p < 0,05$), escore de lesão microscópica (-0,68; $p < 0,05$) e o tempo pós-infecção (-0,61; $p < 0,05$). A expressão da IL-1 β foi significativamente correlacionada com o escore de lesão de microscópica (0,55; $p < 0,05$). A expressão do gene codificador da IL-6 foi significativa e positivamente correlacionada ao escore de lesão macroscópicas pulmonares (0,73; $p < 0,05$). Ainda, foi encontrada correlação significativa e direta (0,69;

p<0,05) com os escores de lesões microscópicas e a expressão do gene codificador da IL-8.

A expressão do gene codificador de INF- γ foi correlacionada significativamente ao escore de lesões macroscópicas (-0,69; p<0,05), o tempo de soroconversão (-0,66; p<0,05) e a estimativa de cópias de fragmentos do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* em amostras de pulmão (-0,74; p<0,05). Enquanto que correlação negativa e significativa foi encontrada entre a expressão de TNF- α e GPD (-0,56; p<0,05).

4. Discussão

O mecanismo fisiopatológico da formação de lesões de consolidação crânio-ventral em pulmão de suínos infectados por *M. hyopneumoniae* ainda não está completamente elucidado (Betlach et al., 2019). Nesse sentido este estudo teve como objetivo investigar fatores imunológicos por meio da expressão dos genes codificadores de citocinas e a dinâmica da carga bacteriana nas referidas lesões, e conseqüentemente avaliar como esses fatores se comportam em ao longo do tempo de 56 dpi, buscando correlações que levassem a um melhor entendimento dos processos patológicos.

As lesões de consolidação pulmonar crânio-ventral apresentaram-se mais acentuadas, com coloração vermelho escura, nos intervalos de 14dpi e 28 dpi, com 18,46% e 15,84% de áreas de lesão macroscópica, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os escores de lesões macroscópicas pulmonares dos intervalos de 14 e 28 dpi, mas sim desses dois intervalos em relação aos intervalos de 42 e 56 dpi. Além disso, nos intervalos de 42 dpi e 56 dpi, as lesões foram observadas em menor intensidade com pontos de coloração mais acinzentada e consistência mais mole (tipo “*Fish flesh*”), compatível com fases mais avançadas da enfermidade (Maes et al., 2008). Os resultados de lesões macroscópicas pulmonares após infecção experimental com *M. hyopneumoniae* encontrados neste estudo corroboram os achados de estudos anteriores, uma vez que todos encontraram lesões macroscópicas mais acentuadas por volta dos 14-28 dpi com tendência a redução com o tempo pós-infecção (Sørensen et al., 1997; Kwon et al., 2002; Villarreal et al., 2009; Woolley et al., 2012).

Ainda, as lesões macroscópicas apresentaram tendência a regredir à medida em

que a infecção pelo *M. hyopneumoniae* evoluiu, fato este reforçado pela correlação negativa encontrada entre o tempo de infecção e o tamanho médio das lesões correspondente a cada intervalo pós-infecção estudado. Nesse sentido, Maes et al. (2008) relataram que no início da fase crônica da enfermidade ocorre regressão das lesões pulmonares, em animais a campo, por volta de 10 a 14 semanas pós infecção, que, no entender desses autores parece ser induzida pelo início da resolução do processo inflamatório no tecido pulmonar.

Já o escore de lesão microscópica mostrou uma tendência inversa de aumento ao longo do tempo (0,64; $p < 0,05$), sendo que aos 56 dpi todos animais (4/4) apresentaram escore 4, o mais característico de infecção por *M. hyopneumoniae* (Livingston et al., 1972), enquanto aos 14 dpi, o escore médio foi de 2,25. A PES é uma enfermidade de evolução classicamente crônica (Thacker et al., 2012), sendo assim é plausível que as lesões microscópicas mais características da enfermidade sejam encontradas em animais com maior tempo de infecção, como no presente estudo, do 28º dpi em diante, e principalmente aos 56 dpi, fato confirmado no presente estudo pela correlação significativa obtida entre o aumento do escore e o tempo de infecção (0,54; $p < 0,05$).

A correlação positiva e significativa entre a quantificação do agente e os escores de lesão microscópica (0,69) mostram que uma maior carga bacteriana no tecido pulmonar está associada com o desenvolvimento de lesões características da infecção por *M. hyopneumoniae*. Amostras de pulmão com escores 3 e 4, de suínos infectados naturalmente, apresentaram tendência significativamente maiores de serem positiva em uma *nested* PCR para *M. hyopneumoniae*, do que amostras com lesões escore 0, 1 e 2 (Calsamiglia et al., 2000); já neste estudo os grupos 42 dpi e 56 dpi apresentaram escores de lesão microscópica 3,25 e 4, respectivamente, e também apresentaram maiores estimativas do agente em lesões.

A propósito, já foi relatado na literatura que esse agente possui ação mitogênica em alguns tipos de linfócitos de suíno, resultando na hiperplasia de BALT (Messier, S., Ross, 1991), que é uma lesão microscópica classicamente associada a infecção por *M. hyopneumoniae*.

A quantificação bacteriana estimada em lesões de pulmão mostrou que houve

aumento da população do agente ao longo do tempo, fato constatado pela correlação significativa e positiva encontrada (0,65) e, ainda, as amostras colhidas aos 56 dpi apresentaram médias do número de cópias do gene P102 significativamente maiores do que as amostras correspondentes aos 14 e 28 dpi. No entanto, estes achados acima quando contrastados com a evolução de lesões macroscópicas pulmonares, que mostrou uma tendência à redução ao longo do tempo (-0,58), evidenciaram que neste estudo, a carga de *M. hyopneumoniae* presente no pulmão não estava diretamente relacionada à extensão de lesões macroscópicas nesse mesmo órgão. Reforçando isso, pode-se citar o fato de as amostras correspondentes aos 14 dpi terem alcançado a maior média de área de lesão pulmonar e, ao mesmo tempo, terem revelado a menor estimativa de quantificação bacteriana em áreas lesadas desse órgão.

Os resultados encontrados neste estudo evidenciam que a severidade e extensão das lesões macroscópicas no pulmão de animais infectados experimentalmente não são determinadas somente pela carga bacteriana no pulmão, e sim por ação conjunta do agente com fatores da resposta imune individual do hospedeiro (Redondo et al., 2009; Wooley et al., 2012). Thacker et al. (2012), apontaram que reações inflamatórias desencadeadas pelas respostas imunes/imunopatológicas do hospedeiro são um importante fator determinante do desenvolvimento das lesões de consolidação crânio-ventral induzidas por *M. hyopneumoniae* no pulmão.

Nesse sentido, a análise da expressão dos genes de citocinas foi utilizada para entender melhor a reação inflamatória pulmonar resultante da infecção. Citocinas são mediadores essenciais produzidos pela interação hospedeiro-patógeno com o objetivo de eliminar agente invasores bem como iniciar, modular e resolver a inflamação produzida em resposta a patógenos (Li et al., 2014).

Neste estudo, o gene da IL-6 apresentou-se mais expresso na fase inicial da inflamação, i.e., aos 14dpi e levemente suprimido nos outros intervalos pós-infecção estudados. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e envolvida no estímulo a fagocitose, mitose de células B e produção de proteínas de fase aguda (Murtaugh, 1994). A produção de IL-6 já foi citada na literatura como resposta inicial a infecção por *M. hyopneumoniae* em cultivo de células dendríticas da medula óssea (Fourour et al., 2019) e nesse estudo aparentemente foi estimulada no

período inicial (até os 14 dpi) da infecção no tecido pulmonar.

A correlação significativa direta (0,79) encontrada entre o nível de expressão do gene de IL-6 e a área de lesão pulmonar, aponta para um provável envolvimento dessa citocina no processo inflamatório e formação de lesões macroscópicas pulmonares (Damte et al., 2015), uma vez que sua expressão foi maior no mesmo intervalo pós-infecção que apresentou a maior área de lesão macroscópica pulmonar.

Entretanto, é possível notar-se que a expressão do gene se apresentou suprimida nos intervalos que apresentaram maiores quantificações do agente em lesões de pulmão. Um dos mecanismos já relatados de imunomodulação por parte do patógeno é a indução de apoptose em macrófagos alveolares via aumento do estresse oxidativo e ativação da Caspase-3 (Bai et al., 2013), uma vez que estes tipos celulares apresentam papel fundamental na resposta inflamatória causada pelo agente (Damte et al., 2015). Estudo *in vitro* demonstrou que *M. hyopneumoniae* estimula a expressão do gene do citocromo P450 1A1 em macrófagos alveolares, resultando em resposta de supressão dos genes de IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-8 (Fang et al., 2016). Dessa forma, seria possível que *M. hyopneumoniae* suprimisse a expressão dessa citocina em fases mais adiantadas da infecção (28 dpi a 56 dpi), agindo diretamente nos macrófagos alveolares e conseqüentemente modulando o desenvolvimento da imunidade, fato demonstrado nesse estudo pela ineficiência por parte da resposta inflamatória na eliminação do agente, apesar de mais estudos serem necessários para melhor elucidar esses mecanismos.

Já o INF- γ , foi negativamente correlacionado com o escore de lesão macroscópica (-0,69), indicando que quanto maior a expressão de INF- γ menores foram as lesões macroscópicas. Nesse contexto foi relatado que suínos selecionados geneticamente para se ter um resposta de INF- γ aumentada, também apresentaram correlação negativa (-0,45) com a lesões macroscópicas em pulmão, quando desafiados com *M. hyopneumoniae* (Sato et al., 2016). As principais ações desta citocina estão relacionadas a diferenciação de linfócitos T em Th1 (Fourour et al., 2019), assim como na ativação de macrófagos e estímulo nestas células da atividade fagocítica e bactericida em sítios de lesões teciduais (Rodríguez et al., 2007), bem como a apresentação de antígenos à células T indiferenciadas (Shen et al., 2017). A relação entre linfócitos Th como uma da

vias ativadas no combate a infecção por *M. hyopneumoniae* já foi apontada como importante na geração de respostas de imune-proteção contra essa bactéria por estudos anteriores (Garcia-morante et al., 2017) assim como na patogenia da infecção por outros micoplasmas que causam infecção respiratória em outras espécies (Jones et al., 2002).

Por outro lado, a quantificação estimada do agente em amostras de lesão pulmonar correlacionou-se negativamente à expressão de INF- γ , assim como o tempo de soroconversão. Nesse aspecto, INF- γ possui ação estimuladora do processamento e apresentação dos antígenos, fase primordial para o desenvolvimento de imunidade adaptativa ao patógeno, resultando na ativação da resposta imune celular e humoral e consequentemente na soroconversão (Suzue et al., 2003).

A produção de INF- γ já foi demonstrada por imuno-histoquímica em células do BALT de suínos infectados por *M. hyopneumoniae* (Rodríguez et al., 2007). Dessa forma pode-se inferir que a resposta imune ativada pelo INF- γ pode ter resultados positivos no controle na infecção *in vivo*.

Por outro lado, a capacidade de *M. hyopneumoniae* de reduzir a ação apresentadora de antígenos por células dendríticas através da supressão da molécula CD1a já foi demonstrada na cavidade nasal de suínos infectados experimentalmente (Shen et al., 2017), retardando a evolução da resposta imune adaptativa e ainda abrindo espaço para infecções secundárias. Este fato é corroborado pelos achados deste estudo no qual, amostras do intervalo de 56 dpi a carga de *M. hyopneumoniae* nas lesões pulmonares foi maior e houve uma supressão marcante na expressão do gene de INF- γ .

As citocinas IL-1 α e IL-1 β estão diretamente envolvidas nas fases iniciais da resposta inflamatória, possuindo como principal efeito a ativação do processo inflamatório, resultando em febre, vasodilatação e síntese de proteínas de fase aguda, comumente expressas no início do processo inflamatório (Dinarello, 2000). Este fato corrobora os achados deste estudo, em que a expressão de ambos os genes foi maior nos intervalos de 14 dpi (IL-1 α) e 28 dpi (IL-1 β), ocasiões em que se registraram as maiores áreas de lesões macroscópicas pulmonares. Ainda, a correlação entre os níveis de expressão de IL-1 α e o tempo, permite inferir que a expressão dessa citocina possivelmente se reduziu juntamente com a lesões macroscópicas durante o período

abordado nesse estudo.

Ainda, a expressão da IL-1 β mostrou-se correlacionada ao escore de histopatologia. A expressão e liberação de IL-1 β em infecções por *M. hyopneumoniae* já foi relatada em estudos anteriores (Woolley et al., 2012; Zhang et al., 2018). O acúmulo de células inflamatórias no foco da infecção é considerado uma das principais respostas induzidas pela expressão e liberação de IL-1 β e TNF- α (Choi et al., 2006), e essas citocinas são fundamentais para o desenvolvimento da inflamação contribuindo na formação das lesões macroscópica e microscópicas em infecção pelo *M. hyopneumoniae*. Estas informações corroboram os achados deste estudo em que ambas citocinas estavam sendo mais expressas na fase inicial da infecção coincidindo com maiores escores de lesão macroscópica.

O TNF- α é uma citocina pro-inflamatória envolvida em respostas iniciais a patógenos e na ativação do processo inflamatório, produzida principalmente por macrófagos e monócitos sensibilizados com Lipopolissacarídeos (LPS) (Olson et al., 1989; Christodoulides et al., 2018). A produção de TNF- α já foi relacionada a ativação de *Toll like receptors* (TLR) 2 e 6 *in vitro* (Muneta et al., 2003) durante infecção por *M. hyopneumoniae*, indicando que esta citocina está envolvida nas fases iniciais da apresentação de antígenos e no desenvolvimento das respostas inflamatórias e foi sugerido que a sua produção é possivelmente estimulada por PAMPs desse agente infeccioso.

Estudo *in vitro* comparando a expressão de citocinas entre amostras de *M. hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare* (apatogênico), mostrou haver uma maior expressão do gene de TNF- α em infecções pelo segundo em comparação ao primeiro (Fourour et al., 2019), levantando-se a hipótese de que se a diferença na patogenicidade de diferentes espécies de micoplasmas estaria relacionada à capacidade de estimular/suprimir a expressão do TNF- α no período inicial da inflamação. Já, neste estudo, foi possível observar que a expressão do gene do TNF- α além de se restringir à fase inicial do processo inflamatório (14 dpi) estava suprimido nos outros intervalos pós-infecção subsequentes, revelando-se diferente significativamente dos níveis de expressão detectados nos intervalos de 28dpi e 56 dpi. Ainda, não houve correlação dos níveis de expressão do gene de TNF- α com a carga bacteriana nas lesões, uma vez que

aos 14 dpi, momento em que a expressão do gene do TNF- α foi mais alta, a quantidade de cópias do gene P102 de *M. hyopneumoniae* foi a menor.

A expressão de TNF- α apresentou correlação negativa com GPD, indicando que quanto maior a expressão do gene, menor o GPD. Um dos principais efeitos dessa citocina é o catabolismo de proteínas e lipídios o que traz relações desta citocina com a caquexia (Beutler, Cerami; 1989) e, inclusive o TNF- α já foi apontado como sendo responsável pelos efeitos negativos no GPD durante infecção por *M. hyopneumoniae* impactando nas perdas produtivas dos animais afetados (Sato et al., 2016).

Ainda, o TNF- α possui ação sinérgica com IL-1 α e IL-1 β , que estão diretamente envolvidas no início do processo inflamatório (Dinarello, 2000), apesar da sua expressão e secreção já terem sido detectadas apenas a partir da primeira semana pós infecção e continuado por períodos maiores que o normal em infecção por *M. hyopneumoniae* (Choi et al., 2006).

A expressão do gene de IL-1 α também se correlacionou negativamente com GPD. Os genes desta citocina e do TNF- α apresentaram uma maior expressão aos 14 dpi, momento em que houve também maior área de lesão macroscópica e GPD médio numericamente menor. Esses achados corroboram com os dados da literatura que defendem que o processo inflamatório pulmonar principalmente relacionado a IL-1 α e TNF- α estão envolvidos no catabolismo sistêmico que atinge o organismo hospedeiro, refletido-se em prejuízo no GPD (Yang et al., 2004).

A IL- 8 é apontada como um dos principais fatores quimiotáticos de células de defesa, como os neutrófilos, para locais de foco de inflamação, sendo fundamental para o combate da infecção (Christodoulides et al., 2018) e conseqüentemente o desenvolvimento de alterações microscópicas características da infecção por *M. hyopneumoniae*, como a presença de neutrófilos no lúmen de brônquios e bronquíolos, o que caracteriza uma broncopneumonia.

Conseqüentemente, fica clara a correlação direta encontrada entre a expressão do gene de IL-8 e o escore de lesões microscópicas neste estudo. Até os 56 dpi a migração de células inflamatórias ainda se encontrava estimulada, indicando a ocorrência de um processo inflamatório ativo, possivelmente relacionado à presença e ao aumento da carga bacteriana, uma vez que um dos principais estímulos para a

produção de IL-8 são as lipoproteínas de membrana de *Mycoplasma* spp. (Christodoulides et al., 2018).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória inibindo a ação de células NK, macrófagos e linfócitos Th1, todas com papel importante no combate a patógenos bacterianos, porém quando as suas atividades não estão bem reguladas, podem também causar elevados danos teciduais (Couper et al., 2008). Em nosso estudo, a expressão do gene da IL-10 mostrou-se suprimida em todos os períodos pós-infecção analisados e, um aspecto interessante que foi encontrado nas amostras de pulmão de todos esses períodos é que todas elas ainda possuíam lesão ativa com aparente dano tecidual.

Ao contrário dos resultados *in vivo* após a infecção experimental com *M. hyopneumoniae* – amostra virulenta 232, a exposição de células dendríticas em cultivo celular à amostra de *M. hyopneumoniae* 168 atenuada gerou uma super-expressão do gene da IL-10 (Shen et al., 2017), bem como em um outro estudo, a exposição *in vitro* de células dendríticas da medula óssea de suínos a *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* gerou resultados similares a desses últimos autores (Fourour et al., 2019).

A diferença com relação aos resultados de nosso estudo se deve principalmente ao fato de a amostra 232 utilizada na infecção experimental ser patogênica e não atenuada. Assim, deve-se entender que a indução da expressão do gene da IL-10 atuaria como um possível mecanismo de modulação negativa da resposta imune do hospedeiro por parte de bactérias patogênicas (Couper et al., 2008). Entretanto, não parece ser o caso no período abordado neste estudo (56dpi), em que o gene da IL-10 estava predominantemente suprimido nos quatro pontos amostrados.

5. CONCLUSÃO

As alterações patológicas e a estimativa da carga bacteriana analisadas nos períodos incluindo o 14^o; 28^o, 42^o e 56^o dias após a infecção experimental em suínos com o *M. hyopneumoniae* evidencia que a resposta inflamatória do hospedeiro está mais envolvida na formação de lesões macroscópicas de consolidação crânio-ventral no pulmão do que a quantidade desse patógeno presente nesse órgão. Ainda, a expressão dos genes das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e a supressão da expressão da citocina inflamatória IL-10 em áreas com lesões pulmonares, parecem

estar mais relacionadas aos efeitos patológicos na infecção do pulmão e no compartimento sistêmico; avaliado nesse caso pela redução no GPD dos animais experimentalmente infectados.

6. DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse neste trabalho.

7. FINANCIAMENTO

Os autores gostariam de agradecer o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para a execução deste trabalho (Processo FAPESP: 2016/18698-2) e a CAPES, código de pesquisa 001.

8. REFERÊNCIAS

- Ahn, K.K., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Seo, M.J., Kim, S.H., Kim, M.Y., Cho, K.D., Lee, B.H., Chae, C., 2009. Identification of interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6 expression in lungs from pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by in situ hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 441–445. doi:10.1292/jvms.71.441
- Andersen, C.L., J.L.J. and T.F.Ø., 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- Bai, F., Ni, B., Liu, M., Feng, Z., Xiong, Q., Shao, G., 2015. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet. Microbiol.* 175, 58–67. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.013
- Bai, F., Ni, B., Liu, M., Feng, Z., Xiong, Q., Xiao, S., Shao, G., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155, 155–161. doi:10.1016/j.vetimm.2013.07.004
- Betlach, A.M., Maes, D., Garza-Moreno, L., Tamiozzo, P., Sibila, M., Haesebrouck, F., Segalés, J., Pieters, M., 2019. *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: Current trends and

- proposed terminology for genomic classification. *Transbound. Emerg. Dis.* 1–15.
doi:10.1111/tbed.13233
- Birkenheuer, A. J.; M. G. Levy; E. B. Breitschwerdt. 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *Journal of Clinical Microbiology* Sep; 41(9): 4172–4177.
- Bruce Beutler, A.C., 2002. THE BIOLOGY OF CACHECTIN/TNF- A PRIMARY MEDIATOR OF THE HOST RESPONSE 8, 101–118.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Calsamiglia, M., Collins, J.E., Pijoan, C., 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet. Microbiol.* 76, 299–303. doi:10.1016/S0378-1135(00)00245-5
- Choi, C., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Lee, Y.H., Kim, O., Park, H.K., Kim, S.H., Hwang, K.K., Chae, C., 2006. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 134, 40–46.
doi:10.1016/j.diamond.2005.07.012
- Christodoulides, A., Gupta, N., Yacoubian, V., Maithel, N., Parker, J., Kelesidis, T., 2018. The Role of Lipoproteins in *Mycoplasma*-Mediated Immunomodulation. *Front. Microbiol.* 9, 1–9.
doi:10.3389/fmicb.2018.01682
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* 180, 5771–5777. doi:10.4049/jimmunol.180.9.5771
- Damte, D., Lee, S.J., Birhanu, B.T., Suh, J.W., Park, S.C., 2015. Sonicated protein fractions of *Mycoplasma hyopneumoniae* induce inflammatory responses and differential gene expression in a murine alveolar macrophage cell line. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 2153–2159. doi:10.4014/jmb.1506.06049
- Devries, M.E., Ran, L., Kelvin, D.J., 1999. On the edge: The physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. *Semin. Immunol.* 11, 95–104. doi:10.1006/smim.1999.0165
- Dinarello, C. a, 2000. impact of basic research on tomorrow ' s Proinflammatory Cytokines. *Chest* 118, 503–508. doi:10.1378/chest.118.2.503
- Fang, X., Zhao, W., Xu, J., Tu, F., Wang, X., Li, B., Fu, Y., Ren, S., 2016. CYP1A1 mediates

- the suppression of major inflammatory cytokines in pulmonary alveolar macrophage (PAM) cell lines caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 132–138. doi:10.1016/j.dci.2016.06.023
- Fourour, S., Fablet, C., Tocqueville, V., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Kempf, I., Marois-Créhan, C., 2018. A new multiplex real-time TaqMan® PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. *J. Appl. Microbiol.* 125, 345–355. doi:10.1111/jam.13770
- Fourour, S., Marois-Créhan, C., Martelet, L., Fablet, C., Kempf, I., Gottschalk, M., Segura, M., 2019. Intra-Species and Inter-Species differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma Hyopneumoniae*, *M. Hyorhinis*, and *M. Flocculare*. *Pathogens* 8, 1–12. doi:10.3390/pathogens8010034
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 184, 326–333. doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.029
- Garcia-morante, B., Segale, J., Fraile, L., Llarde, G., Coll, T., Sibila, M., 2017. Potential use of local and systemic humoral.pdf 1–14.
- Garcia-Morante, B., Segalés, J., Fraile, L., Pérez de Rozas, A., Maiti, H., Coll, T., Sibila, M., 2016. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: A Comparative Review. *J. Comp. Pathol.* 154, 125–134. doi:10.1016/j.jcpa.2015.11.003
- Hwang, M.H., Damte, D., Lee, J.S., Gebru, E., Chang, Z.Q., Cheng, H., Jung, B.Y., Rhee, M.H., Park, S.C., 2011. *Mycoplasma hyopneumoniae* induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NFκB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Vet. Res. Commun.* 35, 21–34. doi:10.1007/s11259-010-9447-5
- Jones, H.P., Tabor, L., Sun, X., Woolard, M.D., Simecka, J.W., 2002. Depletion of CD8 + T Cells Exacerbates CD4 + Th Cell-Associated Inflammatory Lesions During Murine *Mycoplasma* Respiratory Disease . *J. Immunol.* 168, 3493–3501. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3493
- Kuramae-Izioka, 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* for RAPD. *Rev. Unimar* 19, 683–689.
- Kwon, D., Choi, C., Chae, C., 2002. Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. *Vet. Pathol.* 39, 584–587. doi:10.1354/vp.39-5-584

- Li, B., Du, L., Sun, B., Yu, Z., Liu, M., Feng, Z., Wei, Y., Wang, H., Shao, G., He, K., 2014. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0101968
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Livingston, C.W., Stair, E.L., Underdahl, N.R., 1972. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33, 2249–2258.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 126, 297–309. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.008
- Messier, S., Ross, R.F., 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res.* 52, 1497–1502.
- Meyns, T., Maes, D., Calus, D., Ribbens, S., Dewulf, J., Chiers, K., de Kruif, A., Cox, E., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2007. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Vet. Microbiol.* 120, 87–95. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.010
- Muneta, Y., Uenishi, H., Kikuma, R., Yoshihara, K., Shimoji, Y., Yamamoto, R., Hamashima, N., Yokomizo, Y., Mori, Y., 2003. Porcine TLR2 and TLR6: Identification and Their Involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection. *J. Interf. Cytokine Res.* 23, 583–590. doi:10.1089/107999003322485080
- Murtaugh, M.P., 1994. Porcine cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 37–44. doi:10.1016/0165-2427(94)90118-X
- Nygaard, A.B., Jørgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M., 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 8, 1–6. doi:10.1186/1471-2199-8-67
- Okino, C.H., Ibelli, A.M.G., Brentano, L., Zanella, R., Groke Marques, M., 2018. Evaluation of candidate reference genes for investigation of the uterine tissue and corpus luteum of pigs on day 6 after artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 198, 202–209. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.09.020
- Olson, N.C., Salzert, W.L., Mccallt, C.E., Carolina, N., Salzer, W.L., Mccall, C.E., 1989. BIOCHEMICAL , PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS OF ENDOTOXEMIA Contents Part 1 : The Biochemistry of Endotoxin Part 2 : Physiological Aspects of Endotoxemia 10, 511–629.

- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet. Microbiol.* 134, 261–266. doi:10.1016/j.vetmic.2008.08.016
- Pointon, a M., Byrt, D., Heap, P., 1985. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aust. Vet. J.* 62, 13–8.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Redondo, E., Masot, A.J., Fernández, A., Gázquez, A., 2009. Histopathological and Immunohistochemical Findings in the Lungs of Pigs Infected Experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 140, 260–270. doi:10.1016/j.jcpa.2008.12.008
- Rodríguez, F., Quesada, O., Poveda, J.B., Fernández, A., Lorenzo, H., 2007. Immunohistochemical Detection of Interleukin-12 and Interferon- γ in Pigs Experimentally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 136, 79–82. doi:10.1016/j.jcpa.2006.11.001
- Sato, T., Okamura, T., Kojima-Shibata, C., Kadowaki, H., Suzuki, E., Uenishi, H., Suzuki, K., 2016. Correlated response of peripheral blood cytokines with selection for reduced mycoplasma pneumonia of swine lesions in Landrace pigs. *Anim. Sci. J.* 87, 477–483. doi:10.1111/asj.12462
- Shen, Y., Hu, W., Wei, Y., Feng, Z., Yang, Q., 2017. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* on porcine nasal cavity dendritic cells. *Vet. Microbiol.* 198, 1–8. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.018
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E., Pedersen, M.W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23–34. doi:10.1016/S0378-1135(96)01266-7
- Straw, B. E, Bäckström, L., Lemman, A.D., 1986. Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 8, 106–112.
- Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T., Koyasu, S., 2003. In vivo role of IFN- γ produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur. J. Immunol.* 33, 2666–2675. doi:10.1002/eji.200323292
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D.E.S.N., de Lara, A.C., Kunrath, C.F., Pieters, M., 2017. Detection

- of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Vet. Microbiol.* 203, 215–220. doi:10.1016/j.vetmic.2017.03.025
- Thacker, E. L., Minion, C. 2012. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 10a Ed., Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. John Wiley & Sons, Ames, EUA, pp. 779-797.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12.
doi:10.1093/nar/gks596
- Villarreal, I., Maes, D., Meyns, T., Gebruers, F., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2009. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* 27, 1875–1879. doi:10.1016/j.vaccine.2008.12.005
- Woolley, L.K., Fell, S., Gonsalves, J.R., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., Jenkins, C., Eamens, G.J., 2012. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet. Microbiol.* 161, 186–195. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.025
- Yang, J., Hooper, W.C., Phillips, D.J., Talkington, D.F., 2004. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 157–168.
doi:10.1016/j.cytogfr.2004.01.001
- Zhang, Z., Wei, Y., Liu, B., Wu, Y., Wang, H., Xie, X., Feng, Z., Shao, G., Xiong, Q., 2018. Hsp90/Sec22b promotes unconventional secretion of mature-IL-1 β through an autophagosomal carrier in porcine alveolar macrophages during *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Mol. Immunol.* 101, 130–139.
doi:10.1016/j.molimm.2018.06.265

CAPÍTULO 3- Dinâmica e cronologia da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* amostra 232 no trato respiratório de suínos experimentalmente infectados

1. INTRODUÇÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é a bactéria mais prevalente em infecções respiratórias de suínos (Takeuti et al., 2017a), sendo apontada como o principal agente causador da pneumonia enzoótica suína (PES), enfermidade de caráter crônico, caracterizada por tosse seca não produtiva, queda no ganho de peso diário dos animais, alta morbidade e baixa mortalidade (Sibila et al., 2009; Vranckx et al., 2012).

O agente possui como porta de entrada a via respiratória, sendo que o sucesso da infecção depende da capacidade de adesão às células ciliadas do trato respiratório presentes em traqueia, brônquios e bronquíolos (Thacker e Minion, 2012; Maes et al., 2018). Ainda, *M. hyopneumoniae* é um agente de multiplicação lenta, sendo que um dos fatores de virulência já relatados seria uma maior velocidade de multiplicação (Meyns et al., 2007), o que resultaria em uma maior carga bacteriana colonizando o trato respiratório do hospedeiro. No entanto, dados sobre a evolução da carga bacteriana de *M. hyopneumoniae* durante o curso de uma infecção em suínos são escassos na literatura.

A presença do agente no trato respiratório superior é considerada incomum, já a concentração de *M. hyopneumoniae* em porções mais caudais do trato respiratório é apontada como sendo cem vezes maior do que em porções mais craniais (Otagiri et al., 2005). Por outro lado, a detecção em pulmão (por imuno-histoquímica) só se mostrou possível após 28 dpi (Kwon et al., 2002).

Suabes traqueais e de brônquios são apontados como uma amostra sensível e acurada para detecção do agente (Fablet et al., 2010; Vangroenweghe et al., 2018) indicando que este possa ser um possível sítio preferencial de colonização por parte do agente. Por fim, a análise de lavado traqueobrônquico (LTB) tem alta sensibilidade para a detecção do microrganismo, uma vez que permite amostrar toda a árvore brônquica do animal (Kwon et al., 2002, Marois et al., 2007; Marois et al., 2010).

Entretanto, não existem informações acuradas sobre a distribuição da população

bacteriana nesses sítios bem como alterações nas diferentes fases da infecção, informação esta, que poderia ser útil na escolha de qual amostra será coletada para diagnóstico, ou mesmo sobre os padrões de excreção do agente facilitando a transmissão (Fablet et al., 2010). Sendo assim, este estudo teve como objetivo estimar a carga bacteriana de *M. hyopneumoniae* em diferentes porções anatômicas do trato respiratório de suínos experimentalmente infectados, e suas possíveis alterações em quatro momentos da fase clínica da PES.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Delineamento e infecção experimental*

Um total de 24 suínos da raça Large White, com aproximadamente 28 dias de idade, provenientes de uma fazenda livre de *M. hyopneumoniae*, foram utilizados neste estudo. Os animais foram convenientemente separados em controle (n=8) e infectados (n=16), e cada grupo foi alojado em instalações diferentes, visando mitigar problemas de biossegurança durante o período experimental.

Os animais foram alojados em baias com acesso livre à água e alimentados duas vezes ao dia com ração. Após a chegada, os suínos passaram por sete dias de adaptação nas instalações, momento em que foram colhidos suabes nasais e amostras de sangue, com o objetivo de se assegurar o status de livre de infecção por *M. hyopneumoniae*. Todos os animais foram negativos tanto na qPCR como no ELISA para o agente sob estudo, sendo considerados aptos para utilização no estudo.

No dpi 0, os animais foram inoculados com 10 mL de meio Friis esterilizado (grupo controle) ou 10 mL de macerado de pulmão de suíno experimentalmente infectado por *M. hyopneumoniae* estirpe 232 (10^6 CCU/mL) (grupo infectado) e diluído em meio Friis. A infecção foi realizada via intratraqueal, de acordo com o padrão recomendado pela literatura para infecções experimentais (Garcia-Morante et al., 2016). Neste procedimento, os animais foram contidos, e com o auxílio de um laringoscópio, o cateter foi inserido na traqueia. Em seguida, 10 ml do meio puro ou do inóculo foram instilados pela sonda, e essa, lavada com 10 mL de solução fisiológica em seguida.

Após a infecção, os animais foram examinados a cada três dias, momento em que foi feito exame clínico e a temperatura era aferida. Semanalmente, foram colhidas amostras de sangue e suabes nasais. A cada 14 dias dois animais do grupo controle e quatro do grupo infectado foram aleatoriamente escolhidos, eutanasiados (Indução com Xilazina 1mg/Kg intramuscular, seguida de injeção de Cloreto de potássio (KCl) intracardíaco e necropsiados, momento em que foram realizados o escore de lesão pulmonar e a coleta de amostras para posterior análise. Neste sentido, foram coletadas amostras nos seguintes pontos no tempo 14 dpi, 28 dpi, 42 dpi e 56 dpi. O detalhamento da composição dos grupos e as respectivas datas de necropsia podem ser encontrados na Tabela 1.

Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da FCAV Unesp Câmpus Jaboticabal e aprovado com o número de protocolo 9.952/16 e foi conduzido seguindo os princípios de ética e bem-estar animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Tabela 1. Quantidade de animais de cada um dos grupos e as respectivas datas de necropsia para coleta de amostras biológicas.

	Data da necrópsia				Total
	14dpi*	28dpi	42dpi	56dpi	
Controle	2	2	2	2	8
Infectado	4	4	4	4	16
Grupo	GI	GII	GIII	GIV	24

*dpi- dias pós infecção

2.2. Exame físico, coleta de amostras de soro e suabes nasais

A partir do 0 dpi, os animais foram avaliados clinicamente a cada três dias, momento em que a temperatura era aferida e os animais examinados em busca de sinais clínicos compatíveis com a infecção por *M. hyopneumoniae*, caracterizados principalmente por tosse seca não-produtiva. Semanalmente, amostras de sangue de cada animal foram coletadas por punção da jugular utilizando sistema à vácuo fechado

(Vacutainer, BD - EUA). Em seguida, o sangue foi centrifugado 8.000 g por 15 minutos e 1mL de plasma sanguíneo foi coletado e armazenado em microtubos (Axygen, EUA) a -20°C até o uso.

Amostras de suabes nasais de cada animal foram colhidas, utilizando suabes de algodão (Absorve, Brasil) inseridos nas narinas e rotacionados de duas a três vezes e acondicionados em microtubos livres de DNAses e RNAses (Axygen, EUA) contendo 500 µL de PBS esterilizado, pH 7,4 (Sigma- Aldrich, EUA) e imediatamente estocados a -20°C até o uso.

2.3. *Detecção de anticorpos (IgG) anti- M. hyopneumoniae*

A detecção de anticorpos (IgG) anti-*M. hyopneumoniae* no soro dos animais foi realizada utilizando-se kit de ELISA indireto *M. hyo. Ab test* (IDEXX, EUA). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, sendo posteriormente lidos em aparelho espectrofotômetro iMARK (Biorad, EUA) no comprimento de onda de 650 nm. O cálculo do valor S/P foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, como os animais foram experimentalmente infectados e mantidos em instalações isoladas, resultados suspeitos (S/P entre 0,3 e 0,4) foram consideradas positivas as amostras com valor de S/P maior que 0,3 ao invés de 0,4 como preconizado pelo fabricante.

2.4. *Avaliação post-mortem do escore de lesão pulmonar e colheita de amostras para detecção e quantificação de cópias do gene p102 de M. hyopneumoniae.*

A cada 14 dias (até dpi 56) dois animais do grupo controle e quatro do grupo infectado foram aleatoriamente escolhidos e eutanasiados com o seguinte protocolo: Xilazaina 1mg/Kg, seguida de Propofol 16mg/Kg via intracardíaca e finalizado com sangria. Durante a necropsia, os pulmões foram separados e realizou-se a avaliação do escore de lesões compatíveis com pneumonia por *M. hyopneumoniae*. Foram consideradas compatíveis com a infecção lesões de consolidação em lobos crânio-ventrais (lobos cardíacos, lobos intermediários e lobo acessório) do pulmão; sendo que

qualquer outro tipo de alteração não foi considerada nessa avaliação. A classificação do escore foi realizada de acordo com o método de avaliação previamente publicado por Christensen et al. (1999). Brevemente, cada um dos lobos pulmonares era visualmente avaliado e a porcentagem de área de superfície acometida por lesões foi estimada e em seguida multiplicada pelo peso que cada lobo pulmonar representava do peso total do pulmão. Amostras de traqueia três diferentes porções anatômicas foram colhidas de cada animal, sendo uma amostra na porção cranial (da laringe até o 12º anel), porção média (13º anel ao 24º anel cartilaginoso) e porção caudal (25º anel até a bifurcação dos brônquios). Cada amostra foi acondicionada em microtubos (Axygen, EUA) livres de DNAses e RNAses, identificada e imediatamente congelada – 80°C até o uso.

Amostras de lavado traqueobrônquico (LTB) foram colhidas utilizando pipeta de vidro esterilizada. Brevemente, 15mL de solução esterilizada de *Phosphate Buffered Saline* (PBS), (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, EUA) foram inseridas na traqueia próximo a divisão nos dois brônquios. O pulmão foi então massageado para que o líquido se espalhasse bem pelas vias aéreas e em seguida, com auxílio de pipetador automático, puxou-se o lavado, que foi armazenado em criotubos com 1,5 mL livres de DNAses e RNAses (Corning, EUA) e imediatamente acondicionado a -80°C até a análise.

Amostras de lesões pulmonares de consolidação crânio-ventral, consideradas características de infecção por *M. hyopneumoniae* foram coletadas para se confirmar o envolvimento do agente nas referidas lesões. Fragmentos de pulmão de aproximadamente um centímetro foram coletados, armazenados em criotubos (Corning, EUA) livres de DNase e RNase e imediatamente estocados a -80°C até o uso.

2.5. Colheita de amostras teciduais para histopatologia

Durante a necropsia, fragmentos de três porções anatômica de traqueia foram coletados para realização do escore de lesão microscópica. Os fragmentos foram coletados na porção cranial (da laringe até o 12º anel), porção média (13º anel ao 24º anel cartilaginoso) e porção caudal (25º anel até a bifurcação dos brônquios) e armazenados em formalina tamponada 10% por 24 horas e posteriormente transferidas para álcool 70%. As lâminas foram confeccionadas de acordo com o procedimento

padrão para histopatologia, sendo coradas com Hematoxilina- Eosina (HE) e lidas em microscópio de luz.

O escore das lesões microscópicas foi definido baseando-se na descrição de lesões causadas por *M. hyopneumoniae* em traqueia na literatura (Maxie et al., 2015). As lesões foram graduadas de 0 a 4, de acordo com os critérios expostos na Tabela 2.

Tabela 2. Critérios utilizados para classificação dos escore de lesão em amostras biológicas de traqueias de animais experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* amostra 232.

Escore	Descrições das lesões
0	Sem lesões
1	Hiperplasia de epitélio, cílios presentes em quantidade normal
2	Hiperplasia de epitélio, cílios em quantidade reduzida, focos de hemorragia
3	Hiperplasia de epitélio com redução na quantidade de cílios, hiperplasia glandular e/ou aumento de células caliciformes
4	Hiperplasia epitélio, ausência de cílios, hiperplasia glandular, aumento de células caliciformes e notável infiltrado de células inflamatórias

2.6. Extração de DNA das amostras biológicas

Para a extração do DNA das amostras coletadas de pulmão, traqueia, LTB e suabes nasais foi realizado protocolo de extração *in house* (Kuramae-Izioka, 1997). Brevemente, 0,5 g de traqueia, 0,5g de amostra de lesão pulmonar, ou 250 µL de LTB foram misturados a 600 µL de tampão de lise (160 mM de solução de Tris-HCl pH 8,0; 60 mM de EDTA pH 8,0 (Sigma-Aldrich, EUA); 20 mM de NaCl (Êxodo Científica, Brasil); 0,5% SDS (Sigma- Aldrich, EUA) e 0,5% de PVP (Sigma-Aldrich, EUA) acrescentado com 1,6 µL de 2 – mercaptoetanol (Sigma Aldrich, EUA), agitado em vórtex e incubado em banho seco por 65°C por 40 minutos. Terminada a incubação, acrescentavam-se

250 µL de acetato de potássio (Sigma-Aldrich, EUA), 5M, em cada amostra e era realizada nova incubação em gelo por 30 minutos, agitando-se por inversão a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha) a 4°C por 10 minutos a 13.000 g.

Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e passado para outro tubo, foram acrescentados 550 µL de solução de clorofórmio (Merck, Alemanha) e álcool isoamílico (24:1) (Acros Organics, EUA), agitado em vórtex e centrifugado novamente a 4°C, 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente colhido e passado a outro tubo com 1 mL de álcool absoluto (Emsure®, Merck – Alemanha) e misturado por inversão. As amostras então foram incubadas *overnight* (16 horas) em freezer -20°C para precipitação do DNA.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10°C por 20 minutos a 13.000g e em seguida descartou-se o sobrenadante, acrescentava-se 1mL de solução de álcool 70% (Emsure®, Merck – Alemanha) e agitou-se suavemente o tubo para descolar o pellet precipitado no fundo e procedeu-se a nova centrifugação (10°C por 20 minutos a 13.000 g). Ao final, descartou-se o sobrenadante, e o pellet foi seco a 55°C por duas horas em estufa. Terminada a secagem, acrescentavam-se 70 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM de EDTA) filtrado e incubado a 4°C por quatro horas. Terminada a eluição, o sobrenadante era coletado e colocado em tubos de 200 µL livres de DNase e RNase (Axygen, EUA), quantificados por espectrofotometria (Nanodrop®, Thermo Fisher- EUA) e estocados a -20°C até o uso.

2.7. Avaliação da presença de inibidores no DNA extraído

Procedeu-se a checagem quanto a presença de inibidores na solução de DNA extraído através de técnica de PCR convencional para detecção do gene endógeno do Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*gapdh*), de acordo com o protocolo previamente publicado (Birkenheuer et al., 2003). Somente foram utilizadas para a qPCR amostras em que houvesse amplificação do referido gene. Amostras negativas na PCR para o gene *gapdh* foram submetidas novamente a extração de DNA. A reação foi composta por: 0,5 µM de cada um dos iniciadores (Forward: 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-

3' e Reverse 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') (Invitrogen, EUA), 1 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA), solução tampão 1X (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 1mM de dNTP mix (Invitrogen, EUA), água ultrapura q.s.p. para 19 µL e 1 µL de DNA template, totalizando-se 20 µL. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes configurações: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C, seguido de 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto e mais uma extensão final de 5 minutos em termociclador MyCycler (Bio Rad, EUA). Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich, EUA) corado com 0,1% de Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich, EUA). O gel era lido em transiluminador ChemiDoc MP (Bio Rad, EUA). O tamanho esperado do fragmento amplificado era de 437 bp.

2.8. *Deteção e quantificação de cópias de DNA do gene codificador da proteína P102 de M. hyopneumoniae*

Para se detectar a presença e estimar a quantidade de *M. hyopneumoniae* em fragmentos de pulmão, suabes nasais e LTB, foi utilizada a técnica de quantificação absoluta por qPCR. As amostras de pulmão foram processadas em duplicatas e o ensaio utilizado foi otimizado a partir do protocolo já descrito por Fourour et al. (2018). Os iniciadores e a sonda de hidrólise utilizados na reação possuem como alvo o gene multicópia codificador da proteína de adesão p102 dessa bactéria (GenBank: AE017332.1). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores foram analisadas *in silico* utilizando-se a ferramenta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e não apresentaram similaridade com material genético de outros patógenos de suínos. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores *sense* e *anti-sense* e da sonda de hidrólise (Fourour et al., 2018), estão apresentados abaixo:

Primer *sense*: 5'-TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC-3'

Primer *anti-sense*: 5'- AAATTAAGCTGTTCAAATGC-3'

Sonda de hidrólise 5'- FAM-AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-§BHQ2-3'

A reação foi composta por 1X de Master mix Go taq® (Promega, Madison, EUA), 0,5 µM de cada primer (Invitrogen, EUA), 0,3 µM da sonda de hidrólise (IDT, Iowa City-EUA), água ultrapura q.s.p e 1 µL de DNA template por amostra totalizando 10 µL de reação. A qPCR foi realizada em termociclador de tempo real CFX-96 (Biorad - EUA) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 55,7 °C por 1 minuto. As amostras foram testadas em duplicata e os resultados só foram aceitos para amostras com desvio padrão menor de 0,5 ciclo (Bustin et al., 2009). Caso a diferença fosse maior, as amostras foram testadas novamente em triplicatas.

. 2.9. *Quantificação absoluta de fragmentos do gene P102 de M. hyopneumoniae*

A quantificação absoluta foi realizada utilizando-se curva padrão com diluições seriadas de razão constante igual a 10, iniciando-se em 10⁻¹ até 10⁻⁷. Para isto utilizou-se DNA sintético (GBlock®, IDT, Iowa City, IA, EUA) contendo o fragmento de 150 pb a ser amplificado pelo par de iniciadores apresentado anteriormente. O DNA sintético foi diluído conforme as orientações do fabricante e mantido em concentração estoque de 10⁷ moléculas/µL. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas utilizando-se 45µL de tampão Tris-EDTA (TE 24:1) e 5 µL de solução a 10⁷ do DNA sintético. Os dados de quantificação foram utilizados somente se a eficiência obtida estivesse entre 90% e 105% (Bustin et al., 2009) .

2.10. *Análise estatística*

Todos os dados numéricos gerados foram analisados utilizando-se o programa R (R Core Team, 2018). A normalidade dos dados foi atestada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilkins (SW) e a homocedasticidade foi aferida utilizando-se o Teste de Bartlett, ambos a 95% de confiança. Dados que obtiveram distribuição normal e homocedástica, as diferenças significativas entre médias da quantificação do agente foram detectadas

pelo teste ANOVA e as comparações múltiplas feitas pelo teste de Tukey e teste de Duncan ($p < 0,05$). Casos em que não houve normalidade dos dados, as diferenças significativas foram detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas pelo teste de Dunn, ambos $p < 0,05$. A ocorrência de correlações entre as variáveis foi atestada pelo teste de Spearman (dados não-paramétricos) e pela correlação de Pearson (dados paramétricos). Os dados foram previamente analisados pelo método de diagnóstico de Cook e distância de Leverage, e as parcelas apontadas como *outliers* ou valores influentes foram retiradas das análises.

3. RESULTADOS

3.1. *Detecção de sinais clínicos nos animais infectados*

A avaliação clínica dos animais do grupo controle não identificou sinais clínicos compatíveis com a infecção por *M. hyopneumoniae* e tampouco febre. Quanto ao grupo infectado, sinais clínicos de tosse seca não-produtiva, associados à enfermidade, foram notados a partir do 10^o dpi e duraram até o final do experimento, no 56^o dpi. Manifestações de febre foram notadas esporadicamente em animais infectados, variando de 39,7 °C a 40,3°C. Episódios de febre foram detectados a partir do 3 dpi até o final do experimento, entretanto este sinal clínico não foi detectado em todos os animais (12/16).

3.2. *Detecção de anticorpos (IgG) anti-M. hyopneumoniae no soro dos animais*

Todos os animais foram negativos para a presença de anticorpos anti-*M. hyopneumoniae* no -7 dpi e 0 dpi. Todas as amostras do grupo controle foram negativas até o fim do experimento. Três animais eutanasiados aos 14 dpi não tinham soroconvertido, entretanto, como esses animais tiveram resultados positivos na qPCR, não foram excluídos do estudo. A soroconversão dos animais infectados se deu de forma não uniforme, sendo que oito animais (50%) soroconverteram aos 14 dpi, três (19%) aos

21 dpi e dois (13%) aos 28 dpi.

Detecção do DNA de Mycoplasma hyopneumoniae em amostras biológicas

3.3. Validação da reação qPCR

Os parâmetros obtidos nas reações de qPCR utilizadas para a detecção e quantificação do DNA de *M. hyopneumoniae* para as amostras de pulmão, suabe nasal, LTB e traqueia foram: Eficiência variando de 92% a 98,3%, R^2 entre 0,996 e 1,0, Intercepto-y entre 39 e 40,8 e slope variando de -3,36 a -3,5; Todos os parâmetros estavam de acordo com o preconizado por Bustin et al. (2009), sendo os resultados utilizados para a quantificação do agente.

3.4. Detecção de DNA de M. hyopneumoniae em suabes nasais

As amostras provenientes de todos os animais do grupo controle foram negativas, na qPCR baseada em um fragmento do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae*, durante todo o período experimental. A presença de material genético de *M. hyopneumoniae* nas amostras de suabes nasais foi detectada a partir do 7 dpi em 25% (7/28) dos animais infectados chegando a 100% dos animais no 49 dpi, entretanto os animais apresentaram padrão intermitente demonstrando resultados negativos entre após já terem obtido um resultado positivo. Todos os animais do grupo infectado tiveram pelo menos um resultado positivo durante o experimento. A porcentagem de animais positivos em cada dia amostrado pode ser encontrada na Figura 1.

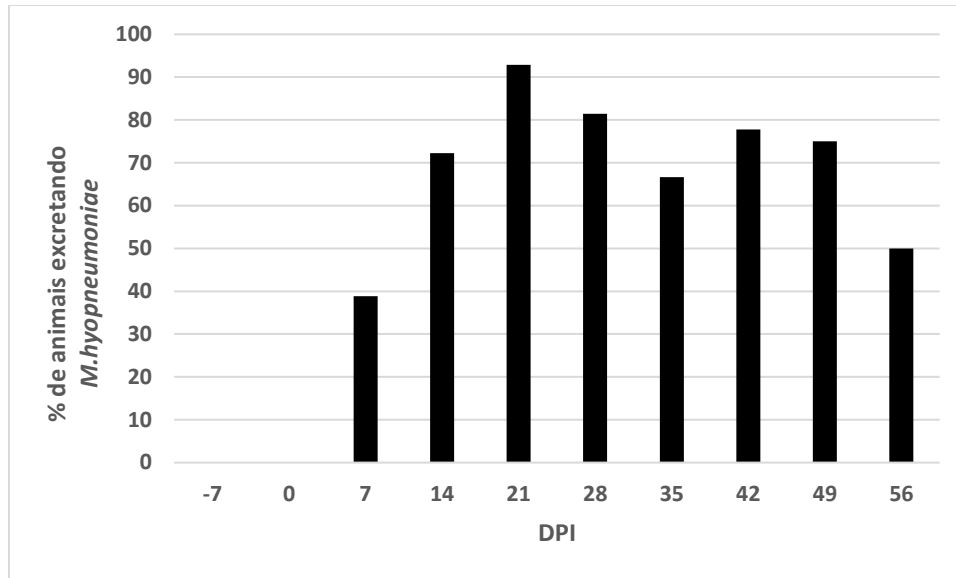


Figura 1. Porcentagem de animais com amostras de suabe nasal positivo para a presença de DNA de *M. hyopneumoniae* 232 ao longo do período avaliado no experimento (56 dpi).

3.5. Amostras de lesões pulmonares de consolidação crânio-ventral

As amostras de lesão pulmonar provenientes dos animais infectados foram todas positivas para *M. hyopneumoniae*. Os animais do grupo controle foram todos negativos na qPCR para o agente.

3.6. Escore de lesões macroscópicas em pulmão

Durante a necropsia, os pulmões dos animais foram retirados e o escore de lesão pulmonar foi avaliado de acordo com a metodologia de Christensen et al. (1999). Foram consideradas apenas para os fins do estudo lesões de consolidação crânio-ventral, compatíveis com a infecção por *M. hyopneumoniae*. As médias de área de lesão obtidas em cada grupo foram 14 dpi- 13,40%; 28 dpi- 13,22%; 42 dpi- 9,61% e 56 dpi- 8,75%. Lesões cicatríciais e áreas cinzentas de cicatrização foram notados em pulmões aos 42 dpi e 56 dpi. Não houve diferença significativa entre os grupos.

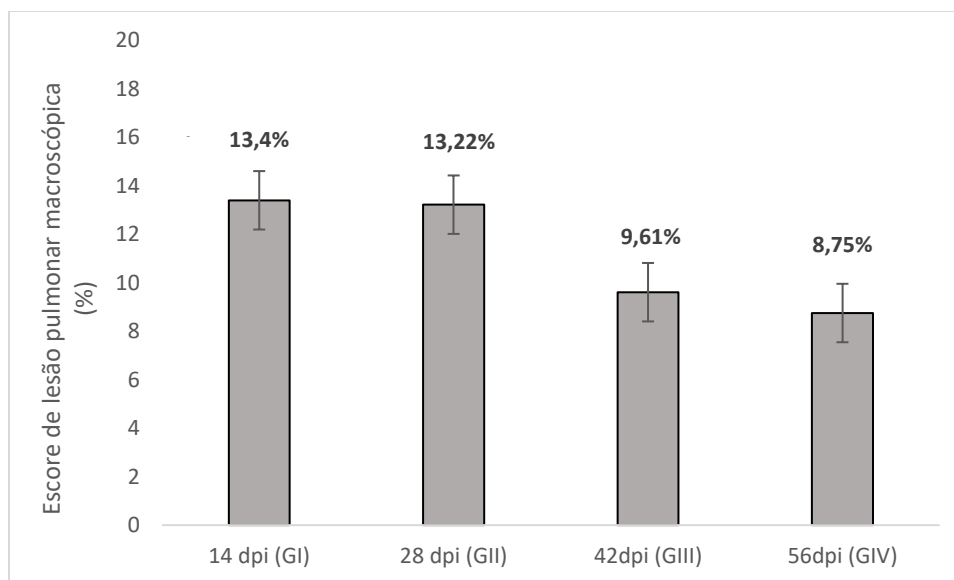


Figura 2. Gráfico de barras contendo a área de lesão consolidação pulmonar média dos quatro grupos dos animais infectados por *M. hyopneumoniae* estirpe 232 aos 14dpi, 28dpi, 42dpi, 56dpi de acordo com o método de Christensen et al. (1999).

3.7. Escore de lesões microscópicas em traqueias

Os resultados da avaliação de lesão microscópica dos três fragmentos de traqueia (TC, TM e TCL) podem ser encontrados na tabela 3.

Tabela 3. Escore de lesão microscópica em três porções anatômicas diferentes de traqueia: traqueia cranial (TC), traqueia média (TM) e traqueia caudal (TCL) de animais experimentalmente infectados com *M. hyopneumoniae* amostra 232.

Grupo	Controle			Infectado		
	TC	TM	TCL	TC	TM	TCL
14 dpi	0,5(±0,5)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	1,0 (± 0,82)	1,75 (±1,7)	2,75 (± 1,5)
28 dpi	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	2,25 (±1,71)	1,75 (± 0,38)	2,75 (±0,96)
42 dpi	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0,75 (± 0,5)	1,75 (± 0,5)	2,25 (± 1,5)
56 dpi	0,5(±0,5)	0,5(±0,5)	0,5(±0,5)	1,5 (± 1,0)	3,0 (± 0,81)	3,0 (± 0,81)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os escores de lesão

histopatológica entre os períodos amostrados e nem entre os tipos de amostra. Correlações significativas foram encontradas entre os escores de lesão microscópica em TM (0,48; $p < 0,05$) e a quantificação estimada do agente em TM; e o escore de lesão microscópica em TCL com a quantificação estimada do agente em TCL (0,61; $p < 0,05$).

3.8. *Detecção e quantificação de fragmentos do gene da proteína P102 de M. hyopneumoniae em amostras de LTB e traqueia*

As amostras de LTB obtidas dos animais controle foram todas negativas na qPCR para o agente em estudo, enquanto as amostras provenientes de animais infectados experimentalmente foram todas positivas. As médias obtidas da estimativa de cópias do fragmento do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* nas amostras de LTB por grupo foram 14 dpi: $6,0 \times 10^4$; 28 dpi: $1,3 \times 10^6$; 42 dpi: $2,9 \times 10^5$ e 56 dpi: $4,9 \times 10^5$. Diferenças significativas ($p > 0,05$) foram detectadas entre a quantificação aos 28 dpi que foi maior do que a quantificação aos 14 dpi, mas não foi diferente dos 42 e 56 dpi. Não houve correlação com o tempo de infecção nem com o escore de lesão macroscópica.

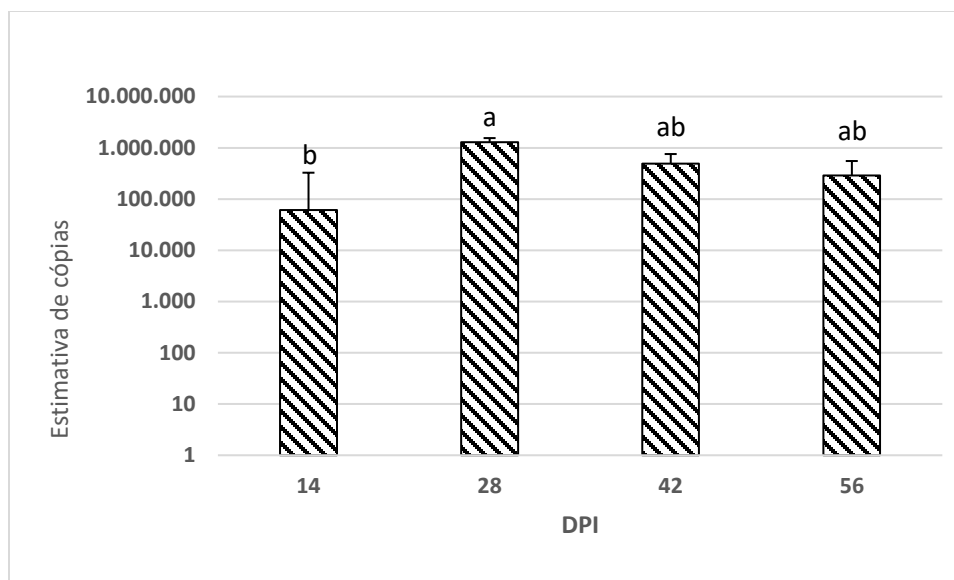


Figura 3. Estimativa de cópias de fragmento do gene P102 de *M. hyopneumoniae* 232 detectadas em amostras de LTB, em diferentes pontos no tempo de suínos experimentalmente infectados. Letras diferentes indicam diferença significativa a detectada pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

As amostras de traqueia foram analisadas de três diferentes regiões anatômicas dos animais, sendo elas: traqueia cranial (TC), traqueia média (TM) e traqueia caudal (TCL). Não houve amostras positivas provenientes de animais não infectados (controle).

As médias da estimativa de quantificação do agente nas amostras de TC por grupo foram: 14 dpi- $4,1 \times 10^3$; 28 dpi- $3,1 \times 10^5$; 42 dpi- $1,1 \times 10^3$; 56 dpi- $5,5 \times 10^3$. Não houve diferença significativa entre os grupos. A correlação de Spearman detectou a existência de correlação (0,58; $p < 0,05$) entre o escore de lesão macroscópica e a estimativa de cópias do gene da proteína P102 de *M. hyopneumoniae* na porção cranial da traqueia; e entre a quantificação estimada do agente nas amostras de LTB e a estimativa em TC ($\rho: 0,58$; $p < 0,05$) Não houve correlação entre a quantificação e o tempo de infecção.

Com relação as amostras de TM, as médias obtidas por grupo foram: 14 dpi- $8,7 \times 10^3$; 28 dpi- $3,3 \times 10^2$; 42 dpi- $3,2 \times 10^4$; 56 dpi- $2,0 \times 10^5$. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. O coeficiente de Spearman indicou duas correlações significativas, positivas e moderadas: entre a estimativa e o tempo (0,59; $p < 0,05$) e entre a estimativa de cópias do gene P102 de *M. hyopneumoniae* e o escore de lesão macroscópica (0,57; $p < 0,05$). Não houve correlação entre a quantificação estimada em

TM e em LTB.

Já com relação às amostras de TCL, as médias obtidas foram: 14 dpi- $2,5 \times 10^4$; 28 dpi- $2,7 \times 10^4$; 42 dpi- $5,5 \times 10^3$; 56 dpi - $1,3 \times 10^5$. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos. Também não houve correlação entre as estimativas e o tempo e o escore de lesão macroscópica; e entre a quantificação estimada do agente em TCL e LTB.

Analisando-se pelo tipo de amostra, a média das amostras TCL ($2,2 \times 10^5$) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a média das amostras de TC ($2,8 \times 10^3$), mas não de TM ($1,0 \times 10^5$). Os resultados da quantificação média de cópias do gene P102 pelo tipo de amostra de acordo com o tempo de infecção estão apresentados na Figura 3.

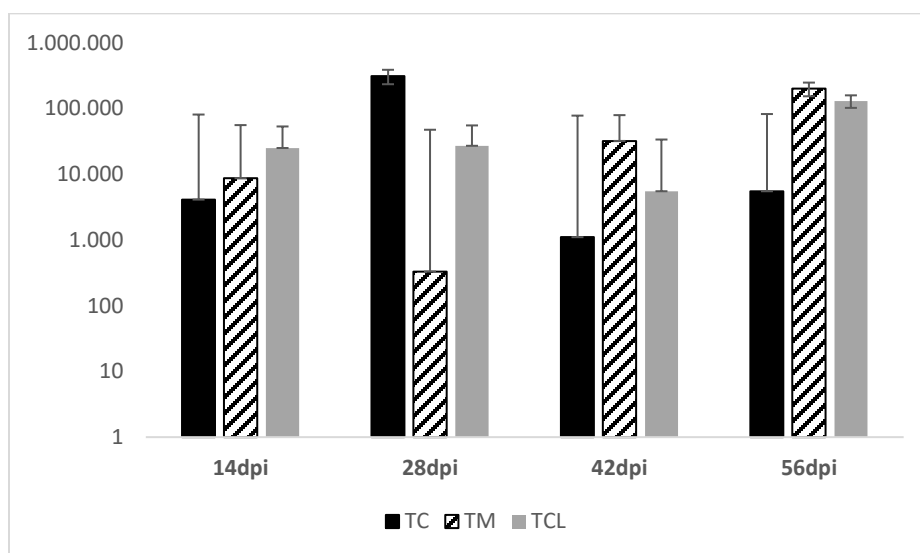


Figura 4. Gráfico com as médias de cópias genômicas do *M. hyopneumoniae* estirpe 232 nos diferentes tipos de amostra de traqueia e no tempo.

4. DISCUSSÃO

Mycoplasma hyopneumoniae é um agente que apresenta papel fundamental no complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) (Takeuti et al., 2017b). Sendo assim compreender a dinâmica desse agente durante a infecção é de grande importância para o diagnóstico precoce da infecção, e conseqüentemente, em ações de controle e

prevenção da enfermidade em rebanhos suínos.

A confirmação do sucesso da infecção foi atestada pela detecção de material genético de *M. hyopneumoniae* nas diversas amostras biológicas coletadas, lesões macroscópicas compatíveis e a detecção de anticorpos séricos (IgG) contra o agente em questão.

O diagnóstico sorológico é comumente utilizado na identificação de infecções por *M. hyopneumoniae*, apesar de muitas vezes sofrer interferência de anticorpos colostrais e vacinais, que não são possíveis de se diferenciar de anticorpos de infecções naturais (Maes et al., 2018). Ainda, *M. hyopneumoniae* é notadamente um agente que produz soroconversão lenta em animais infectados, devido a característica do agente de não invadir o parênquima do trato respiratório, e sim, de se aderir à superfície do epitélio, dificultando a apresentação de antígeno para o sistema imune (Sibila et al., 2009).

Neste estudo, a metade dos animais foram soropositivos aos 14 dpi (8/16), sendo que todos os outros animais soroconverteram até o 35 dpi, exceto três dos animais eutanasiados aos 14 dpi. Padrão semelhante de soroconversão foi descrito em infecção experimental utilizando a mesma amostra (232) e o mesmo teste de ELISA para diagnóstico sorológico (Pieters et al., 2017). Ainda, animais experimentalmente infectados apresentam soroconversão mais rápida do que os naturalmente infectados, devido a maior quantidade de microrganismos utilizados na infecção (Fano et al., 2005), como foi o caso deste estudo.

As lesões de consolidação crânio ventral observadas apresentaram maior escore aos 14 dpi e 28 dpi (13,4% e 13,22% respectivamente), sendo que não houve diferença estatística entre ambos intervalos. O período de quatro semanas, ou 28 dias, é apontado na literatura científica como o ponto em que o escore de lesão macroscópica tende a ser maior (Sørensen et al., 1997), apesar de que infecções com amostras pouco patogênicas do agente, as lesões macroscópicas levam até oito semanas para se desenvolverem (Villarreal et al., 2009).

A detecção de anticorpos em soro e LTB já foi correlacionada com a presença de lesões de consolidação crânio-ventral em suínos (Fraile et al., 2010; Garcia-morante et al., 2017), similarmente, nesse estudo, a maioria dos animais soroconverteram entre 14 dpi e 28 dpi, grupos em que foram registrados os maiores escores de lesão

macroscópica.

Com relação à detecção de DNA do agente em suabes, a mesma teve início da detecção foi 7 dpi atingindo a maior quantidade de animais positivos aos 21 e 28 dpi (92% e 81%, respectivamente), sendo possível inferir que este foi o período de maior carga bacteriana nos animais durante o período estudado. Neste presente estudo, o sinal clínico de tosse foi notado no 10 dpi, e todos os animais tiveram pelo menos um resultado positivo em amostras de suabes a partir do 21 dpi.

Os aerossóis eliminados durante os acessos de tosse são apontados como via de eliminação do agente para o meio externo e uma das principais formas de transmissão (Sibila et al., 2009). *M. hyopneumoniae* é um agente que possui certo tropismo por porções mais caudais do trato respiratório do suíno como a traqueia caudal e os brônquios, sendo levado ao trato respiratório superior durante acessos de tosse causados pela secreção excessiva de muco durante o processo inflamatório (Kwon et al., 2002; Marois et al., 2007).

Com relação aos resultados obtidos a partir da estimativa por qPCR para carga bacteriana nas amostras de traqueia cranial, maior valor foi observado aos 28 dpi, mesmo momento em que ainda havia alto escore de área de lesão pulmonar macroscópica. Infecção experimental de marrãs utilizando a mesma amostra (232) do agente, foram encontrados menores valores de Cq aos 28 dpi em amostras de suabe de laringe (Roos et al., 2016), região anatomicamente próxima às amostras de traqueia cranial coletadas nesse estudo.

A correlação encontrada entre a área de lesão pulmonar e a estimativa de cópias do gene P102 do agente nas amostras de porções craniais de traqueia (coeficiente: 0,58) e média (0,57) pode exemplificar este fato, uma vez que a reação inflamatória aumenta a produção de muco, que leva a obstrução dos bronquíolos e brônquios, resultando no sinal clínico de tosse (Redondo et al., 2009; Thacker & Minion, 2012).

Sendo assim, animais com um maior escore de lesão pulmonar muito possivelmente apresentariam sinais clínicos de tosse com maior intensidade, e conseqüentemente, uma maior população do agente em porções craniais do trato respiratório superior e possível excreção para o meio externo por aerossóis (Maes et al., 2018).

Com relação às amostras de porção caudal da traqueia, não houve diferença significativa entre os grupos nem correlação com as lesões macroscópicas no pulmão. Ainda, considerando-se os resultados por tipo de amostras (TC, TM e TCL), ao invés dos grupos, a estimativa bacteriana média em amostras de traqueia caudal foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que nas amostras médias e craniais.

Estes achados corroboram achados anteriores em que o agente possui tropismo por regiões mais caudais da traqueia (Marois et al., 2007), local em que a carga bacteriana se apresentou elevada durante todo o período do experimento, bem como não houve correlação com o tempo, indicando que a população do agente na região não apresentou tendência a se alterar no período abordado por este estudo (56dpi). Otagiri et al. (2005) mostraram uma concentração 100 vezes maior de *M. hyopneumoniae* em traqueia e brônquios do que na cavidade nasal, uma vez que esta última só é colonizada, por meio dos acessos de tosse.

Já Fourour et al. (2019), também encontraram maiores quantidades de material genético do agente em suabes traqueais do que quando comparado com suabes nasais e tonsilas. Amostras de suabe nasal já foram apontadas por apresentarem baixa sensibilidade para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* quando comparadas com outras amostras como LTB e suabes de laringe (Pieters et al., 2017).

Ainda, suabes traqueobrônquicos e amostras de LTB tem sido utilizados com sucesso na detecção e confirmação de infecção pelo agente em rebanhos suínos com boa sensibilidade (Fablet et al., 2010; Rawal et al., 2018; Vangroenweghe et al., 2018), devido a maior população do agente na região amostrada, quando comparada a regiões mais craniais do trato respiratório, fato demonstrado por este estudo.

Quanto ao escore de lesão microscópica nas amostras de traqueia, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas, é possível perceber que as porções TCL apresentaram escores numericamente maiores quando comparadas com amostras de TC e TM. Ainda, a correlação com a quantificação estimada do agente nas amostras de TM e TCL (coeficientes: 0,48 e 0,61) permite inferir que o tropismo do agente por essas regiões acabou por induzir maiores escores de lesão microscópica. Debey e Ross (1994) também encontraram correlação entre a quantidade de CCU/mL inoculada em cultivo de células de traqueia de suínos com a perda de cílios nas células epiteliais.

Recentemente, infecção experimental por *M. hyopneumoniae* em cultivo celular de células de traqueia produziu alterações patológicas, possivelmente indutores de apoptose (Paes et al., 2019). As alterações teciduais notadas nesse estudo, como a perda de cílios, hiperplasia de epitélio respiratório e alterações em células caliciformes já foram descritas em infecção experimental *in vitro* (DeBey e Ross, 1994). Estas alterações teciduais, principalmente a ciliostase, resultam em enfraquecimento de mecanismos de defesa do trato respiratório e culminam em uma maior susceptibilidade dos animais infectados a infecções respiratórias secundárias com maior mortalidade (Thacker & Minion, 2012).

No geral, as maiores médias de cópias do gene P102 do agente nas amostras de LTB e TCL, quando comparados as observadas em traqueia cranial e média, também reforçam o tropismo do agente por porções mais caudais do trato respiratório. Estudos anteriores já haviam sugerido que maiores concentrações do agente seriam encontradas em brônquios (Fraile et al., 2010; Woolley et al., 2012).

No entanto, a correlação positiva e significativa (0,58) encontrada entre a estimativa da quantificação do agente em amostras de TC e em LTB, apontou haver relação entre a carga bacteriana nestes sítios. Muito provavelmente, uma maior quantidade de *M. hyopneumoniae* na árvore brônquica resultaria em uma maior quantidade do mesmo na traqueia cranial carregados nos acessos de tosse.

A média de estimativas do gene P102 do agente nas amostras de LTB foi significativamente maior aos 28 dpi, quando comparada com as estimativas aos 14 dpi, 42 dpi e 56 dpi. Analisando este resultado, pode-se afirmar que no período abordado neste estudo a população do agente colonizando a árvore brônquica do hospedeiro atingiu seu ápice próximo aos 28 dpi, coincidindo com o período de maior número de animais com suabes nasais positivos e a maior quantificação em do agente em amostras de traqueia cranial.

5. CONCLUSÃO

Maiores concentrações do agente foram detectadas nas amostras de traqueia caudal e na árvore brônquica (LTB) dos animais experimentalmente infectados, confirmando o tropismo de *M. hyopneumoniae* por porções mais caudais do sistema respiratório do suíno. Os escores mais altos de lesões microscópicas encontradas nas amostras de traqueia media e caudal, e a correlação destes com a quantificação estimada do agente evidenciaram a patogenia da infecção nesta região do trato respiratório. Por fim, a quantificação nas amostras de LTB apresentou seu maior valor aos 28 dpi, momento em que havia grande área de lesão pulmonar e maior porcentagem de animais excretando, permitindo inferir ser este o momento de maior expressão da patogênicidade de *Mycoplasma hyopneumoniae* amostra 232 no curso da infecção experimental.

6. DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse neste trabalho.

7. FINANCIAMENTO

Os autores gostariam de agradecer o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para a execução deste trabalho (Processo FAPESP: 2016/18698-2) e a CAPES, código de pesquisa 001.

8. REFERÊNCIAS

- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype ... J. Clin. Microbiol. 41, 4172–4177. doi:10.1128/JCM.41.9.4172
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

- Christensen, G., Sorensen, V., Mousing, J. 1999. Diseases of the respiratory system. In: Diseases of Swine, 8th ed., Straw, B., D'Allaire, S. D., Mengeling, W., Taylor, D. J. Iowa State University Press, Ames, pp. 913-940.
- DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312–5318.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2010. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet. Microbiol.* 143, 238–245. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.001
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Dynamics and persistence of 223–228.
- Fourour, S., Fablet, C., Tocqueville, V., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Kempf, I., Marois-Créhan, C., 2018. A new multiplex real-time TaqMan® PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. *J. Appl. Microbiol.* 125, 345–355. doi:10.1111/jam.13770
- Fourour, S., Marois-Créhan, C., Martelet, L., Fablet, C., Kempf, I., Gottschalk, M., Segura, M., 2019. Intra-Species and Inter-Species differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. Hyorhinis*, and *M. Flocculare*. *Pathogens* 8, 1–12. doi:10.3390/pathogens8010034
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 184, 326–333. doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.029
- Garcia-morante, B., Segale, J., Fraile, L., Llarde, G., Coll, T., Sibila, M., 2017. Potential use of local and systemic humoral.pdf 1–14.
- Garcia-Morante, B., Segalés, J., Fraile, L., Pérez de Rozas, A., Maiti, H., Coll, T., Sibila, M., 2016. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: A Comparative Review. *J. Comp. Pathol.* 154, 125–134. doi:10.1016/j.jcpa.2015.11.003
- Kuramae-Izioka, 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA

- isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* for RAPD. Rev. Unimar 19, 683–689.
- Kwon, D., Choi, C., Chae, C., 2002. Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. Vet. Pathol. 39, 584–587. doi:10.1354/vp.39-5-584
- Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segalés, J., Haesebrouck, F., Pieters, M., 2018. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. Transbound. Emerg. Dis. 65, 110–124. doi:10.1111/tbed.12677
- Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M., 2010. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. J. Appl. Microbiol. 108, 1523–1533. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04556.x
- Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A. V., 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. Vet. Microbiol. 120, 96–104. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.015
- Maxie, M. G., Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C., & Palmer, N. (2015). *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*. Edinburgh: Elsevier Saunders.
- Meyns, T., Maes, D., Calus, D., Ribbens, S., Dewulf, J., Chiers, K., de Kruif, A., Cox, E., Decostere, A., Haesebrouck, F., 2007. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. Vet. Microbiol. 120, 87–95. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.010
- Paes, J.A., Leal Zimmer, F.M.A., Moura, H., Barr, J.R., Ferreira, H.B., 2019. Differential responses to stress of two *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. J. Proteomics 199, 67–76. doi:10.1016/j.jprot.2019.03.006
- Pieters, M., Daniels, J., Rovira, A., 2017. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. Vet. Microbiol. 203, 103–109. doi:10.1016/j.vetmic.2017.02.014
- Rawal, G., Arruda, P., Rademacher, C., 2018. General overview of the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* Laboratory from 2004 to 2016 26, 309–315.

- Redondo, E., Masot, A.J., Fernández, A., Gázquez, A., 2009. Histopathological and Immunohistochemical Findings in the Lungs of Pigs Infected Experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 140, 260–270. doi:10.1016/j.jcpa.2008.12.008
- Roos, L.R., Fano, E., Homwong, N., Payne, B., Pieters, M., 2016. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. *Vet. Microbiol.* 184, 51–58. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.008
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231. doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.020
- Sørensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A.A., Feld, N.C., Friis, N.F., Bille-Hansen, V., Jensen, N.E., Pedersen, M.W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 54, 23–34. doi:10.1016/S0378-1135(96)01266-7
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D.E.S.N., de Lara, A.C., Kunrath, C.F., Pieters, M., 2017a. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Vet. Microbiol.* 203, 215–220. doi:10.1016/j.vetmic.2017.03.025
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D.E.S.N., Pieters, M., 2017b. *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in nylon-flocked and rayon-bud swabs. *J. Microbiol. Methods* 141, 118–120. doi:10.1016/j.mimet.2017.08.007
- Thacker, E. L., Minion, C. 2012. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 10a Ed., Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. John Wiley & Sons, Ames, EUA, pp. 779-797.
- Vangroenweghe, F.A.C.J., Willems, E., Thas, O., Maes, D.G.D., 2018. Confirmation of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a breeding herd through tracheobronchial swab sampling and PCR. *Vet. Rec.* 183, 325. doi:10.1136/vr.104712
- Villarreal, I., Maes, D., Meyns, T., Gebruers, F., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2009. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* 27, 1875–1879.

doi:10.1016/j.vaccine.2008.12.005

Vranckx, K., Maes, D., Sacristán, R.D.P., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2012. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Vet. Microbiol.* 156, 315–321.

doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.007

Woolley, L.K., Fell, S., Gonsalves, J.R., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., Jenkins, C., Eamens, G.J., 2012. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet. Microbiol.* 161, 186–195. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.025