

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS QUIMIOTERÁPICAS COM VALNEMULINA,
TILMICOSINA E TULATROMICINA PARA CONTROLE DA
INFECÇÃO PELO *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS**

Giovani Marco Stingelin

Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**ESTRATÉGIAS QUIMIOTERÁPICAS COM VALNEMULINA,
TILMICOSINA E TULATROMICINA PARA CONTROLE DA
INFECÇÃO PELO *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS**

Discente: Giovani Marco Stingelin

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

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: Clínica Médica Veterinária.

S859e Stingelin, Giovani Marco
Estratégias quimioterápicas com Valnemulina, Tilmicosina e
Tulatromicina para controle da infecção pelo *Mycoplasma*
hyopneumoniae em suínos / Giovani Marco Stingelin. --
Jaboticabal, 2022
72 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Luís Guilherme de Oliveira

1. leitões. 2. doenças respiratórias. 3. pneumonia enzoótica.
4. matafilaxia. 5. antimicrobianos. 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: ESTRATÉGIAS QUIMIOTERÁPICAS COM VALNEMULINA, TILMICOSINA E TULATROMICINA PARA CONTROLE DA INFECÇÃO PELO *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS

AUTOR: GIOVANI MARCO STINGELIN

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

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

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

Prof. Dr. CESAR AUGUSTO POSPISSIL GARBOSSA (Participação Virtual)
Departamento de Nutrição e Produção Animal-VNP-FMVZ/USP / Pirassununga/SP

Prof. Dr. HENRIQUE MEIROZ DE SOUZA ALMEIDA (Participação Virtual)
Colégio Técnico Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. LIVIA MENDONÇA PASCOAL (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás-UFG / Goiânia/GO

Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Médico Veterinário graduado pela Universidade Federal do Paraná - Câmpus Palotina (2006). Possui Especialização em Higiene e Processamento de Produtos de Origem Animal pela UFPR - câmpus Palotina (2009), possui MBA em Gestão Estratégica do Agronegócio pela Fundação Getúlio Vargas (FGV) (2013). Mestre em Medicina Veterinária na Área de Clínica Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, câmpus de Botucatu (2015 -2016). Doutorando da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade "Júlio de Mesquita Filho", UNESP - Jaboticabal-SP na área de Medicina Veterinária Preventiva sob orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Em 2020 foi editor do livro Sanidade e Produção Suína: Atualização, Inovação e tecnologia. Atuou na agroindústria durante sete anos entre 2006 e 2013, como gerente de agropecuária e fomento da Seara Alimentos S.A, ingressou na indústria farmacêutica veterinária em 2014, na Farmabase Saúde Animal, onde atualmente é Gerente Técnico de Suinocultura e Avicultura.

“Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro, e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis

À minha amada mãe Bere (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força nesses últimos anos que tive que enfrentar muitas adversidades e aprender a lidar com a perda.

Ao professor Luís Guilherme pela orientação e pela amizade!

A FCAV – UNESP – Jaboticabal pela oportunidade de fazer parte do seleto grupo de profissionais que tem acesso à educação continuada da mais alta qualidade.

Ao meu pai, a quem eu cresci vendo lecionar 60h/aula por semana para que seus dois filhos tivessem condições de realizar a graduação em Medicina Veterinária em duas das melhores universidades públicas do país.

À minha mãe que infelizmente nos deixou no segundo ano desse doutorado, após termos lutado juntos contra um câncer de cólon. Você mãe, sempre me estimulou a seguir buscando a perfeição, em tudo, sempre nos mínimos detalhes.

À minha esposa Daiana pela paciência nas horas em que eu perdi a minha, em tempos de tantos desafios e muitas tristezas, amo você e te admiro muito!

Às minhas filhas Ana Carolina e Luísa por me fazerem rir e valorizar a vida.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Marina, Gabriel, Karina, Henrique pelo apoio nas análises laboratoriais, nas análises estatísticas e no suporte da redação.

À Farmabase Saúde Animal, comprometida com a saúde animal financiou esse estudo que foi longo e oneroso, mas que está alinhado com o perfil inovador da empresa na busca das melhores ferramentas, para garantir a saúde e a melhora da performance de aves e suínos.

SUMÁRIO**página**

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I – Considerações gerais.....	01
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Problemática das enfermidades respiratórias a campo.....	03
2.2 <i>M. hyopneumoniae</i> como patógeno primário.....	05
2.3 Impacto produtivo causado pela Pneumonia Enzoótica.....	07
2.4 Desafios em relação ao tratamento e alternativas farmacológicas.....	09
3 REFERÊNCIAS.....	13
 CAPÍTULO II – Estratégias quimioterápicas com Valnemulina, Tilmicosina e Tulatromicina para controle da infecção pelo <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em suínos.....	17
Resumo.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Propriedade em que o estudo foi conduzido.....	19
2.2 Design experimental.....	20
2.3 Coleta de amostras.....	21
2.4 Contagem de tosse e espirro.....	22
2.5 Desempenho zootécnico.....	22
2.6 Registro de mortalidade.....	23
2.7 Abate dos animais – avaliação e colheita de amostras.....	23
2.8 Detecção e quantificação de anticorpos por ELISA.....	25
2.9 Extração de DNA e realização de cPCR para o gene gapdh.....	25
2.10. Detecção e quantificação de <i>M. hyopneumoniae</i> por qPCR.....	25
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Quantificação de IgG no soro dos suínos ao longo do tempo.....	28

4.2 Detecção e Quantificação de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> por qPCR em suabe nasal.....	30
4.3 Avaliação dos indicadores sanitários.....	32
4.3.1 Teste de tosse.....	33
4.3.2 Registro de mortalidade.....	33
4.4 Avaliação dos indicadores zootécnicos.....	33
4.5 Quantificação de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em lavado traqueobrônquico e tecido pulmonar por qPCR.....	37
4.6. Avaliação dos cornetos nasais e das lesões pulmonares.....	38
4.6.2 Determinação do Índice para Pneumonia (IPP).....	38
4.7 Análises histopatológicas.....	39
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	47
7. AGRADECIMENTO.....	47
8. CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	47
9. CONFLITO DE INTERESSES.....	47
10. REFERÊNCIAS.....	48
11. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	52
 CAPÍTULO III - Aspectos farmacológicos da valnemulina, tilmicosina e tulatromicina aplicados ao tratamento de doenças respiratórias em suínos.....	53
Resumo.....	53
 1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Estudo de Farmacocinética <i>in vivo</i>	56
2.1.1 Etapa clínica – tilmicosina.....	56
2.1.2 Etapa clínica – valnemulina.....	56
2.1.3 Etapa clínica – tulatromicina.....	57
2.1.4 Colheita de amostras dos estudos.....	57
2.2 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de patógenos respiratórios.....	59

3. RESULTADOS.....	60
3.1 Avaliação da concentração de tilmicosina no tecido alvo e Concentração Inibitória Mínima.....	61
3.2 Avaliação da concentração de valnemulina no tecido alvo.....	62
3.3 Avaliação da concentração de tulatromicina no tecido alvo.....	64
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÃO.....	70
6. AGRADECIMENTO.....	71
7. CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES.....	71
8. CONFLITO DE INTERESSES.....	71
9. REFERÊNCIAS.....	71



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



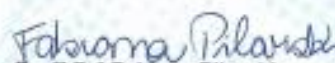
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Quimioterapia com valnemulina em suínos para redução da prevalência de *Mycoplasma hyopneumoniae*, das lesões pulmonares no abate e para incremento do bem-estar-animal**", protocolo nº 009149/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis 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 julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de 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 05 de julho de 2018.

Vigência do Projeto	01/08/2018 a 01/12/2019
Espécie / Linhagem	Suína
Nº de animais	540 Leitões, 40 matrizes (porcas)
Peso / Idade	Leitões – do nascimento (1,3 Kg) até abate (120 Kg), porcas (220 Kg)
Sexo	Amixos os sexos
Origem	Granja comercial de Ponte Nova - MG

Jaboticabal, 05 de julho de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/nº CEP 14094-900 - Jaboticabal/SP - Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fca.unesp.br

Estratégias quimioterápicas com Valnemulina, Tilmicosina e Tulatromicina para controle da infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos

RESUMO – *Mycoplasma hyopneumoniae*, é considerado como agente primário da Pneumonia Enzoótica Suína e atua no Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS). As medidas de controle para o *M. hyopneumoniae* demandam ações estratégicas que compreendem vacinação, medidas de biossegurança e tratamentos farmacológicos efetivos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de fármacos antimicrobianos frente a infecção por *M. hyopneumoniae* a campo. Estudos de farmacocinética dos antimicrobianos, valnemulina, tilmicosina e tulatromicina, bem como uma etapa experimental a campo foram conduzidos para avaliar diferentes protocolos terapêuticos frente a dinâmica de infecção por *M. hyopneumoniae*. Para o estudo a campo, foram selecionadas fêmeas prenhes e suas leitegadas, que foram acompanhadas ao longo das fases até o abate. Ao todo, foram formados quatro grupos: grupo 1: animais não medicados (controle); grupo 2: leitões medicados com valnemulina (10mg/kg), nascidos de fêmeas previamente medicadas com valnemulina (10mg/kg); grupo 3 (G3): leitões medicados com valnemulina (10 mg/kg) e tilmicosina (20 mg/kg) em dois momentos, nascidos de fêmeas previamente medicadas com tulatromicina (2,5mg/kg); e grupo 4 (G4): leitões medicados com valnemulina (5 mg/Kg) em dois momentos, nascidos de fêmeas que foram medicadas previamente ao parto, com valnemulina (5 mg/Kg). Dados de desempenho foram registrados para cada fase e os leitões foram avaliados quanto a ocorrência de tosse e submetidos periodicamente a colheita de amostras de sangue e suabe nasal para avaliação dos títulos IgG anti- *M. hyopneumoniae* detecção e quantificação de *M. hyopneumoniae* por qPCR. Ao abate, aos pulmões dos animais foram avaliados e amostras foram colhidas para exames histopatológicos e de quantificação de *M. hyopneumoniae* por qPCR. Todos os protocolos terapêuticos apresentaram redução nas lesões de consolidação pulmonares e os indivíduos do grupo G2, envolvendo a administração exclusivamente de valnemulina apresentaram melhores resultados zootécnicos, menor mortalidade e baixa carga bacteriana no pulmão. Os resultados são promissores e podem indicar possíveis aliados no controle estratégico da infecção por *M. hyopneumoniae* e do complexo de doença respiratória dos suínos.

Palavras-chave: leitões, doenças respiratórias, pneumonia enzoótica, matafilaxia, antimicrobianos

Chemotherapeutic Strategies with Valnemulin, Tilmicosin and Tulathromycin to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs

ABSTRACT - *Mycoplasma hyopneumoniae* is considered the primary agent of Enzootic Pneumonia and is part of the Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Control of *M. hyopneumoniae* requires strategic measures that include vaccination, biosafety measures, and effective pharmacological treatments. This study aimed to evaluate the use of antimicrobial drugs against *M. hyopneumoniae* infection in the field. A Pharmacokinetic Study of antimicrobials, valnemulin, tilmicosin, and tulathromycin, and also an experimental stage in the field, were carried out to evaluate different therapeutic protocols against the infection by *M. hyopneumoniae*. For the field study, pregnant females and their litters were selected. The piglets were followed through the production phases until slaughter. Altogether, four groups were formed: group 1: non-medicated animals (control); group 2: piglets medicated with valnemulin (10mg/kg), born to females previously medicated with valnemulin (10mg/kg); group 3 (G3): piglets medicated with valnemulin (10 mg/kg) and tilmicosin (20 mg/kg) in two moments, born to females previously medicated with tulathromycin (2.5mg/kg); and group 4 (G4): piglets medicated with valnemulin (5 mg/kg) in two moments, born to females that were medicated previously to farrowing, with valnemulin (5 mg/kg). Performance data were recorded for each phase, and the piglets were evaluated for coughing and periodically submitted to blood and nasal swabe samples collection for evaluation of *anti-M. hyopneumoniae* IgG and detection and quantification of *M. hyopneumoniae*, respectively. At slaughter, the lungs were evaluated and samples were collected for histopathological examinations and quantification of *M. hyopneumoniae* by qPCR. All therapeutic protocols showed a reduction in pulmonary consolidation lesions and individuals in group G2, involving the administration of valnemulin exclusively, presented better zootechnical results, lower mortality, and low bacterial load in the lung. The results are promising and may indicate possible allies in the strategic control of *M. hyopneumoniae* infection and the swine respiratory disease complex.

Keywords: piglets, respiratory diseases, enzootic pneumonia, metaphylaxis, antimicrobials

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

As doenças respiratórias dos suínos integram a principal causa de grandes perdas econômicas para a produção intensiva mundial de suínos. O complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) é responsável por importantes perdas econômicas para a suinocultura e o impacto do CDRS nos rebanhos de suínos é manifestado pela apresentação clínica na forma de tosse, dispneia, apatia, atraso no crescimento e aumento de mortalidade.

Na suinocultura moderna, os sistemas de produção industriais vêm evoluindo de forma constante, de acordo com a demanda de carne suína, o que têm levado à adoção de métodos de produção otimizados. Com isto, ocorreu aumento da densidade de animais, instalações que não comportam a quantidade de animais alojados, bem como, maior concentração de granjas em determinadas regiões geográficas.

Em contra partida, estas condições são tidas como fatores de risco associados a ocorrência de enfermidades infecciosas nos rebanhos. Infecções sistêmicas virais como o Circovírus suíno tipo II (PCV-2) e o vírus da Influenza suína causam imunossupressão e ampliam os riscos de disseminação de enfermidades infecciosas de origem bacteriana, como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Glaesserella parasuis* e *Streptococcus suis*, principalmente as que compõem o complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS), responsável por prejuízos econômicos e sanitários significativos.

O acometimento dos rebanhos por doenças respiratórias implica em inúmeros prejuízos econômicos tais como: piora no ganho de peso diário e da conversão alimentar, aumento na mortalidade, eleva os custos com medicamentos e vacinas, aumenta o tempo de alojamento, o qual exige mais mão-de-obra e disponibilidade de instalações, além das perdas no frigorífico por condenações relacionadas com pneumonias, pleurites e abscessos.

O *M. hyopneumoniae*, é considerado um patógeno primário no CDRS, pelo fato de causar ciliostase, aumento da retenção de muco e modulação do sistema imunológico dos suínos, e com isto, favorece a ocorrência de pneumonia por outros

patógenos considerados secundários como *P. multocida*, *S. suis*, *B. bronchyseptica*, *G. parasuis* e *A. pleuropneumoniae*.

Ainda, o *M. hyopneumoniae* tem como característica a adesão à superfície do epitélio ciliado do trato respiratório o que dificulta a ação dos mecanismos de defesa, bem como reduz a eficácia de tratamentos com antimicrobianos. Outro fator em relação a terapêutica, é que esse microrganismo não possui parede celular, o que faz com que o uso de diversos antimicrobianos seja ineficaz contra este patógeno.

A valnemulina é um antimicrobiano semissintético da classe das pleuromutilinas com extraordinária atividade contra bactérias do gênero *Mycoplasma* e demais bactérias anaeróbicas. A atividade dessa molécula frente ao *M. hyopneumoniae* apresenta resultados superiores quando comparada a ação de compostos pertencentes a classe dos macrolídeos. A valnemulina é utilizada somente em animais, mais especificamente em suínos e disponibilizado somente de forma oral, sendo dessa forma, um fármaco de última geração que possivelmente sofrerá menos restrições futuras quanto ao uso na medicina veterinária, pois a probabilidade de causar resistência bacteriana cruzada em humanos é menor.

No momento do início desse estudo, esta molécula não era comercializada no Brasil para terapêutica em suínos. Desta forma, buscou-se verificar a biodisponibilidade de valnemulina no tecido pulmonar pela detecção do ativo no tecido-alvo usando cromatografia líquida de alta precisão, correlacionando os resultados com o teste de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), para bactérias patogênicas isoladas de casos clínicos de suínos, causadoras de pneumonia e provenientes de bancos de cepas.

Outros antimicrobianos que foram avaliados nesse estudo quanto a sua biodisponibilidade pulmonar e correlacionados com os testes de CIM e CBM, foram tulatromicina e tilmicosina, da classe dos macrolídeos.

A tulatromicina é um macrolídeo semissintético, pertencente ao grupo das azalidas, sub-classe triamilídeo, caracterizado pelo maior espectro de ação, sendo capaz de atuar contra microorganismos Gram-negativos e com características farmacocinéticas muito favoráveis para tratamentos respiratórios como o tempo de meia-vida pulmonar de seis dias, alta concentração no tecido pulmonar e nas células de defesa. A tulatromicina é administrada de forma injetável intramuscular em suínos.

A tilmicosina possui propriedades farmacocinéticas e espectro de ação muito similares a da tulatromicina, porém, só pode ser administrada via oral para suínos, a administração via injetável intramuscular causa vômitos, taquipneia, convulsões e pode causar morte. A tilmicosina é um macrolídeo semi-sintético derivado da tilosina, com amplo espectro de ação contra patógenos respiratórios, alta afinidade pelo tecido pulmonar e pelas células de defesa e com propriedades anti-inflamatórias já descritas. Na etapa a campo do presente estudo, foram aplicados protocolos medicamentosos metafiláticos avaliando alternativas para a redução da transmissão de *M. hyopneumoniae* entre as matrizes e os leitões na fase de maternidade, redução da pressão de infecção nas granjas, diminuição da imunossupressão causada por *M. hyopneumoniae* e, conseqüentemente, melhora do bem-estar dos animais com redução no número de animais enfermos e nas perdas causadas por abscessos/pleurites no abate.

Por fim, o estudo proposto é de grande importância para a suinocultura, visto que estudos avaliando a redução da transmissão do *M. hyopneumoniae* por meio do uso de terapêutica metafilática são escassos e também pelo fato de que atualmente a valnemulina não é comercializada no Brasil. Portanto, os estudos de campo são fundamentais para avaliar a ação desta molécula, bem como a aplicabilidade e resultados do uso do princípio ativo a campo.

2. Revisão de literatura

2.1. Problemática das enfermidades respiratórias a campo

As doenças respiratórias dos suínos integram a principal causa de grandes perdas econômicas para a produção intensiva mundial de suínos (ROSS, 1999). O complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) é responsável por importantes perdas econômicas para a suinocultura e o impacto do CDRS nos rebanhos de suínos é manifestado pela apresentação clínica na forma de tosse, dispneia, apatia, atraso no crescimento e aumento de mortalidade (Pieters et al., 2009).

O prejuízo ocorre devido à piora da conversão alimentar e redução do ganho de peso dos animais, alta morbidade e mortalidade, aumento dos custos com vacinação (Ferraz et al., 2020), aumento dos gastos com antibióticos (Maes et al.,

1996), redução do peso ao abate, além de perdas na qualidade das carcaças ou até condenação das mesmas (Brewster et al., 2017). Na maioria das vezes, vários agentes infecciosos são envolvidos no desenvolvimento destas condições clínicas, tornando inadequada a abordagem reducionista comum de interações patógeno-hospedeiro pelo estudo da infecção de forma isolada (Opriessnig et al., 2011).

Os agentes infecciosos respiratórios causadores podem ser divididos em patógenos primários e secundários ou oportunistas. Patógeno primário pode ser definido como patógeno que pode infectar o animal como o primeiro patógeno único e então facilitar a coinfeção secundária ou oportunista. Estes patógenos respiratórios primários incluem: *Mycoplasma hyopneumoniae*, cepas de alta virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella (B.) bronchiseptica* e vírus como da Influenza suína (SIV). Embora não sejam exclusivos do trato respiratório dos suínos como SIV, outros vírus como Circovírus suínos tipo 2 (PCV-2) e PRRS também podem ser facilitadores de infecções respiratórias (Costa et al., 2006).

Em se tratando de agentes patogênicos e doenças respiratórias em suínos, existem na produção comercial, basicamente dois cenários distintos, sendo um deles, o de granjas que sofrem com as doenças respiratórias causadas por *M. hyopneumoniae* e patógenos secundários, principalmente *Pasteurella multocida* (de Conti et al., 2021) e o outro, o de granjas que apresentam problemas com infecções por *A. pleuropneumoniae* (Hillen et al., 2014). Há também infecções virais que afetam o pulmão e que podem se somar a esse quadro de etiologia complexa, e que favorecem a disseminação das enfermidades respiratórias e ampliam o efeito negativo das infecções primárias nos indivíduos infectados (Stark, 2000).

Os agentes virais, a exemplo da Influenza A, geralmente promovem pneumonia intersticial evidenciada por lesões de consolidação em pontos diversos do parênquima pulmonar e que em conjunto com infecções bacterianas, levam a prejuízos consideráveis à indústria suinícola no mundo todo. Os principais agentes virais envolvidos com pneumonias em suínos são o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS), vírus da influenza suína, coronavírus respiratório e circovírus suíno 2 (PCV-2). Entre esses patógenos, o que provoca maiores prejuízos é o vírus da PRRS, que até o momento não foi detectado no Brasil, sendo assim,

infecções envolvendo o agente são consideradas exóticas no país. Outro patógeno que apresenta grande impacto no sistema respiratório é o PCV-2, porém esse, é controlado de forma adequada em rebanhos vacinados (Opriessnig et al., 2021).

2.2. *M. hyopneumoniae* como patógeno primário

Infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em todo o mundo e resultam em prejuízos financeiros para a indústria de suínos. As perdas se devem principalmente aos custos de tratamento e vacinação, diminuição do desempenho e aumento da mortalidade em decorrência principalmente de infecções secundárias (Holst et al., 2015). O *M. hyopneumoniae* é o principal agente causador da pneumonia enzoótica, uma doença respiratória crônica em suínos, e um dos principais patógenos envolvidos no CDRS (Thacker e Minion, 2012).

M. hyopneumoniae é um microrganismo procarionte da classe dos Mollicutes, são difíceis de serem isolados e cultivados, sendo o suíno o hospedeiro específico (Sobestiansky et al., 2012). O *M. hyopneumoniae* adere ao epitélio respiratório ciliado e causa inicialmente ciliostase, evoluindo para a destruição dos cílios e eventualmente causando a morte da célula epitelial. O processo de aderência, que é um pré-requisito para o início da doença, é multifatorial e complexo (Haesebrouck et al., 2004). A adesão do organismo ao epitélio respiratório, a estimulação de uma reação inflamatória prolongada, bem como a supressão e a modulação das respostas imunes inatas e adaptativas são reconhecidas como passos importantes na colonização e na infecção por parte deste micro-organismo. Como resultado, os animais infectados se tornam mais suscetíveis a infecções por outros patógenos respiratórios (Thacker e Minion, 2010).

Na granja, a fonte de infecção mais importante é a fêmea primípara, que transmite a doença à sua leitegada, logo após o nascimento. Na transição da fase de maternidade para a creche ocorre a mistura de diferentes lotes e em alguns casos de diferentes origens, promovendo a mistura de indivíduos infectados e susceptíveis, resultando na disseminação do patógeno entre os animais. Dados demonstram que a disseminação da infecção é sete vezes mais rápida quando há o contato direto nariz-nariz entre indivíduos de baias distintas por meio divisórias vasadas. Granjas que não praticam o manejo de biosseguridade conhecido como “todos dentro - todos fora”

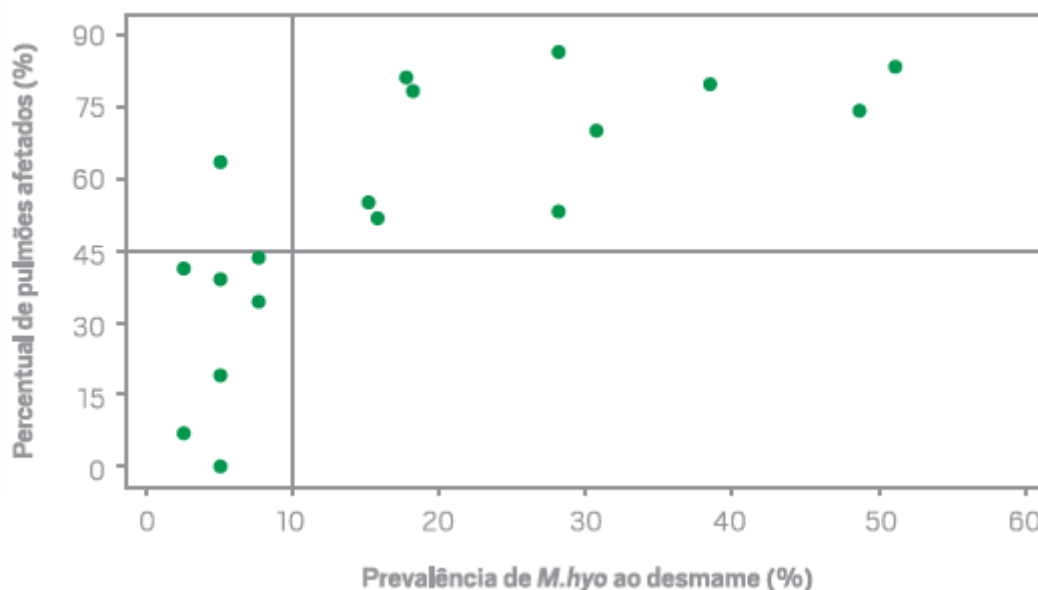
também aceleram a transmissão do patógenos entre lotes (Sobestiansky J. et al., 2012).

As vacinas têm demonstrado sua efetividade contra o *M. hyopneumoniae* na redução dos sinais clínicos e nas lesões pulmonares, porém, mesmo com a vacinação, rebanhos com alta prevalência desse micro-organismo no desmame terão pneumonia na fase de crescimento e terminação. Tal situação sugere que as vacinas comerciais apresentam proteção parcial contra essa enfermidade e não são capazes de eliminar o agente do trato respiratório dos suínos (Pallarés et al., 2015), (Fano et al., 2007).

A transmissão vertical por *M. hyopneumoniae* não foi documentada, portanto, os leitões neonatos são considerados livres do patógeno e os primeiros eventos de exposição ocorrem durante o período de lactação, quando os leitões estão em contato com porcas na fase de excreção do microrganismo (Calsamiglia e Pijoan, 2000). A duração do período de lactação tem sido sugerida como um fator de risco para o estabelecimento de leitões com *M. hyopneumoniae* antes do desmame (Pieters et al., 2014). Acredita-se que a chance de transmissão do agente entre a fêmea e o leitão aumente em 10% para cada dia em que se prolonga o desmame (Giacominni et al., 2016).

A relevância da transmissão precoce dos leitões foi estudada por Fano et al. (2007), que observou correlação entre a prevalência de leitões positivos para *M. hyopneumoniae* no suabe nasal no desmame aos 21 dias de vida, com o percentual de pulmões afetados ao abate (figura 1). A partir dos resultados do estudo é possível constatar que em um grupo de leitões desmamados, se 10% dos animais forem identificados como positivos para *M. hyopneumoniae*, é esperado que ao abate o percentual de pulmões afetados seja superior a 45%.

Figura 1. Correlação da presença de *M. hyopneumoniae* em saúbes nasais ao desmame com a percentagem de pulmões afetados ao abate; $r^2 = 0.6448$, $P = 0.0001$.



Fonte: FANO, E. et al., 2007.

2.3. Impacto produtivo causado pela Pneumonia Enzoótica

Em estudo realizado nos Estados Unidos da América com um milhão de suínos abatidos, sendo deles, aproximadamente 25% dos animais provenientes de granjas positivas para *M. hyopneumoniae*, a redução no ganho de peso diário ao comparar animais positivos com negativos foi de 50 gramas, enquanto que a piora na conversão alimentar foi de 80 gramas e o percentual de animais abatidos foi 2,3% menor (figura 2). Para exemplificar, considerando o cenário brasileiro atual em que o valor médio com ração é de R\$1,60/Kg na fase de crescimento e terminação, uma granja de 1.000 matrizes perderia o equivalente a R\$40.270,78 por mês em decorrência direta da enfermidade.

Figura 2. Diferença de performance entre rebanhos *M. hyopneumoniae* (*M. hyo*) negativo e positivo em um levantamento realizado com um milhão de suínos abatidos nos EUA.

Indicador	<i>M.hyo</i> negativo (1)	<i>M.hyo</i> positivo (2)	Diferença 1-2
Ganho de peso diário (kg)	0,848	0,798	0,05
Taxa de conversão alimentar (kg)	2,65	2,73	-0,080
Mortalidade	2,24%	3,63%	-1,39%
Taxa de Refugos	1,46%	2,37%	-0,91%
Suínos abatidos	96,30%	94%	2,3%
Custo programa medicamentos via ração/suíno	USD 1,64	USD 1,99	-USD 0,35
Outros custos de medicação	USD 0,37	USD 0,63	-USD 0,26

Fonte: Adaptado de Yeske; A contemporary review of *Mycoplasma hyopneumoniae* control strategies (2016).

A suinocultura mundial enfrenta uma série de fatores de risco predisponentes para doenças respiratórias, e apesar dos efeitos benéficos, a proteção induzida com as atuais vacinas contra o *M. hyopneumoniae* é frequentemente incompleta e não impede a colonização nas células epiteliais, apenas proteção parcial (Thacker et al., 2000; Haesebrouck et al., 2004). Portanto, acredita-se que associando as demais medidas de controle a um protocolo medicamentoso adequado, com moléculas com alta eficácia contra *M. hyopneumoniae*, seja possível diminuir a transmissão do agente entre matrizes e leitões durante a maternidade, bem como a transmissão entre leitões nas fases seguintes, diminuindo por consequência a pressão de infecção nas granjas.

2.4. Desafios em relação ao tratamento e alternativas farmacológicas

Segundo Dutra (2017), um estudo conduzido em 25 sistemas de produção no Brasil revelou que em média são utilizados 358,0mg/kg de antimicrobianos (considerando as diferentes moléculas usualmente empregadas), o que é considerado alto quando comparado à tendência global de 172,0mg/kg, bem como o período médio de exposição de 66,3% de a vida dos animais e a exposição em média a pelo menos sete princípios ativos diferentes. Foi constatado que numericamente a média em mg de antimicrobianos administrados difere consideravelmente quando comparados sistemas livre de *M. hyopneumoniae* (222,0 mg/kg) e sistemas positivos (392,0 mg/Kg), contudo a diferença não se mostrou significativa estatisticamente em virtude da amplitude dos valores observados em granjas livres, cuja média em mg variou de 5,4 até 521,4 mg, pois algumas, apesar de livres para *M. hyopneumoniae*, eram positivas para outros patógenos importantes como *Glaesserella parasuis* e *Lawsonia intracellularis*.

Valnemulina, tilmicosina e tulatromicina são, dentre os fármacos utilizados em suínos, os que apresentam maior eficácia contra os patógenos respiratórios e possuem a vantagem de não pertencer ao Grupo III (Quinolonas, Cefalosporinas, Polimixinas e Ácidos Fosfônicos), que é uma categoria de fármacos que apesar de utilizados em animais, é tida como último recurso em virtude da possibilidade de disseminação de genes de resistência que podem causar impactos à saúde humana.

A valnemulina é um derivado semissintético do antibiótico diterpeno pleuromutilina, produzido pelo fungo *Clitopilus passeckerianus*. A molécula pertence ao grupo das pleuromutilinas, é tempo-dependente e apresenta importante atividade contra bactérias anaeróbias (*Fusobacterium necrophorum*, *Brachyspira hyodysenteriae*) e *Mycoplasma* sp. Além disso, a valnemulina é eficiente contra outras bactérias gram-positivas aeróbicas, como *Staphylococcus* spp., *Arcanobacterium pyogenes* e alguns estreptococos. A atuação do composto se dá na inibição da síntese da síntese proteica nas bactérias, ao se ligar à subunidade 50S dos ribossomos (Spinosa et al., 2011; Hirose e Neto, 2012).

Segundo Burch, (2012), em uma comparação de concentração inibitória mínima de 50% (MIC50) de *M. hyopneumoniae* utilizando diferentes antimicrobianos, a valnemulina mostrou melhor efetividade contra o patógeno sendo o MIC ≤ 0.0024

muito inferior ao segundo menor resultado demonstrado pela tilvalosina (≤ 0.0125) e muito inferior a tulatromicina (≤ 0.03).

Em um comparativo entre vários antimicrobianos para prevenção e tratamento da PES, avaliando a redução das lesões pulmonares no abate, a utilização de valnemulina a 10mg/Kg via ração, segundo Burrows, et al. (2001), reduziu 79% das lesões pulmonares. Em um estudo conduzido por Morgan et al. (1996), utilizou-se 20mg/Kg de valnemulina via ração e foi constatado redução das lesões pulmonares em 71%. Segundo Stipkovits et al. (2001), a administração de tilmicosina na ração em doses entre 15 e 20 mg/kg foi capaz de reduzir em 60% a presença de lesões pulmonares por PES. Já a tilvalosina, quando administrada via ração na dose de 2,5mg/Kg foi capaz de reduzir somente 45% das lesões pulmonares no abate.

De acordo com Giguère et al. (2013), as pleuromutilinas têm ação superior aos macrolídeos contra *Mycoplasma* sp. e dentro desse grupo de quimioterápicos antimicrobianos, a valnemulina é aproximadamente duas vezes mais eficiente que a tiamulina contra bactérias em geral, e 30 vezes mais efetiva contra *Mycoplasma* sp. *in vitro* comparada a tiamulina. A valnemulina é aprovada na União Europeia para tratamento e prevenção de pneumonia enzootica, disenteria suína (*Brachyspira hyodysenteriae*), colite espiroquetar (*B. pilosicoli*) e enteropatia proliferativa (*L. intracelullaris*) (Burch, 2004).

A tilmicosina tem uma atividade antibacteriana, incluindo *Mycoplasma* sp., semelhante aos demais macrolídeos, promovendo inibição de bactérias gram-positivas como *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Histophilus* spp., e *Pasteurella* spp, contudo, enterobactérias em geral são resistentes. *P. multocida* e *A. pleuropneumoniae* isolados de suínos com doença respiratória são considerados susceptíveis se o MIC for ≤ 16 µg/mL e resistente se o resultado do MIC for ≥ 32 µg/mL (McClary et al., 2011).

Vários estudos clínicos demonstram a eficácia da tilmicosina administrada via ração na dose de 200 a 400 ppm no tratamento de pneumonias em suínos envolvendo *P. multocida* e *A. pleuropneumoniae* (Paradis, 2004). Em um estudo conduzido por Fittipaldi et al. (2005) suínos foram inoculados com 10^7 UFC de *A. pleuropneumoniae* via intranasal de forma a avaliar a ação da tilmicosina na redução da carga bacteriana

nas tonsilas dos animais. Como resultado, 30 dias após o início do tratamento somente um animal ainda se mostrou positivo no qPCR para *A. pleuropneumoniae*, demonstrando a eficácia da tilmicosina no controle da infecção, podendo ser considerada uma opção em potencial para protocolos que visam eliminar a bactéria dos rebanhos.

Dentre as propriedades farmacocinéticas da tilmicosina estão a baixa concentração no plasma e a elevada biodisponibilidade no tecido pulmonar que apresenta um acúmulo do composto em concentrações superiores a 10 L/Kg, e até 6.2 vezes maior que no plasma (Giguère et al., 2013). A tilmicosina é rapidamente absorvida quando administrada via oral em suínos e lentamente eliminada (tempo de meia-vida de 25 horas) (Shen et al., 2005). A tilmicosina é potencialmente tóxica para suínos quando administrada via intramuscular e é letal em doses entre 10 e 20mg/Kg. Os efeitos tóxicos estão associados principalmente a ação sobre o músculo cardíaco, gerando rápida depleção de cálcio (Main et al., 1996).

A tulatromicina é um antibiótico pertencente à classe dos macrolídeos que tem como característica um anel lactônico macrocíclico, ao qual se ligam moléculas de açúcar. Os macrolídeos são divididos em três grupos de acordo com o número de átomos do anel macrocíclico, sendo a tulatromicina pertencente ao segundo grupo, chamado de azalida, com 15 átomos (Spinosa, 2011).

Os macrolídeos possuem boa distribuição podendo atingir altas concentrações no interior das células, especialmente dentro dos fagócitos. Os antibióticos que pertencem a classe agem inibindo a síntese proteica bacteriana ao se ligarem à subunidade 50S do ribossomo. Os macrolídeos são antibióticos bacteriostáticos, mas também podem se comportar como bactericidas quando administrados em altas concentrações (Spinosa, 2011).

A tulatromicina é um macrolídeo semi-sintético preparado por fermentação (*Streptomyces*) seguido por síntese orgânica, consiste em uma mistura regioisomérica equilibrada de um macrolídeo de anel de 13 membros (10%) e um anel de 15 membros (90), uma nova classe de macrolídeos chamada de triamilídeos. A Tulatromicina é utilizada no tratamento de doenças respiratórias bacterianas em bovinos e suínos em dose única de 2,5 mg por quilograma de peso vivo pela via subcutânea em bovinos e intramuscular em suínos (Giguère, 2013). Os macrolídeos são fármacos alcalinos que

no organismo são capturados por células cuja a acidez é maior que a do plasma. São observadas maiores concentrações de macrolídeos nos tecidos, especialmente nos pulmões. As concentrações permanecem elevadas nos pulmões por no mínimo 72 horas após a aplicação de uma única dose (Spinosa, 2011).

Estudos de farmacocinética em suínos utilizando a dose recomendada de 2,5 mg/kg de peso vivo, em dose única por via intramuscular, indicaram rápida absorção no local da administração. Uma das características dos macrolídeos é a de apresentar meia-vida de eliminação plasmática duradoura, sendo superior a 70 horas bem como o volume de distribuição é relativamente grande, mais de 10 L/kg (Giguère, 2013). Em estudos conduzidos em suínos, observou-se que a meia-vida de eliminação no tecido pulmonar foi excepcionalmente longa durando ao todo seis dias. Os resultados em suínos foram obtidos a partir da razão entre concentração no pulmão e plasma, indicando que o acúmulo da molécula no tecido pulmonar ocorreu como esperado, de forma pronunciada nas fases iniciais do estudo, logo após a administração do antimicrobiano, decaindo de forma lenta e registrando baixas concentrações ao final do estudo (EMA, 2004).

Tendo em vista a crescente preocupação com o uso indiscriminado de antimicrobianos, e em contrapartida a necessidade de implementar medidas complementares a vacinação contra o *Mycoplasma hyopneumoniae*, a utilização de antimicrobianos altamente efetivos de forma racional tem se mostrado uma via em potencial para a obtenção de bons resultados no controle de doenças respiratórias. Baseado nesta premissa o presente teve como objetivos: (i) avaliar a concentração pulmonar e a efetividade da valnemulina, tilmicosina e tulatromicina, analisando conjuntamente os resultados de biodisponibilidade pulmonar e concentração inibitória e bactericida mínima; (ii) analisar os efeitos de diferentes protocolos medicamentosos metafiláticos aplicados de forma estratégica, frente a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos criados a campo.

3. Referências

Burch DGS (2004) Valnemulin for the prevention and the treatment of colitis and ileitis. **Pig Journal** 53:221.

Burch DGS (2012) **Examination of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships of orally administered antimicrobials and their correlation with the therapy of various bacterial and mycoplasmal infections in pigs.** Fellowships Thesis. Royal College of Veterinary Surgeons.

Burrows MR, Morgan JH, Tasker JB, Martin, M (2002) In-feed Aivlosin for control of experimental enzootic pneumonia in pigs. **Proceedings 17th International Pig Veterinary Society Congress**, Ames, Iowa, USA, 2, p. 141.

Calsamiglia M, Collins JE, Pijoan C (2000) Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. **Veterinary microbiology** 76(3):299-303.

Costa ATR, Osório FA, Reis R, Ferreira HB (2006) PRRS serologic studies in Brazil. In: **Proceedings of the 33rd Allen D. Leman Swine Conference**. St. Paul, USA,. p.4.

Dutra CM (2017) **Uso de Antimicrobianos em Suinocultura no Brasil: Análise Crítica e Impacto Sobre Marcadores Epidemiológicos de Resistência.** 93 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP.

Fano E (2005) *Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence at weaning as a predictor of the group's subsequent Mycoplasma status. **Allen D. Leman Swine Conference**, p. 109-113.

Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J (2007) Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research** 71:195-200

Fittipaldi N, Klopfenstein C, Gottschalk M, Broes A, Paradis MA, Dick CP. Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research** 69:146-150.

Giacominni E, Ferrari N, Pitozzi A, Remistani M, Giardiello D, Maes D, Alborali GL (2016) Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* seroconversion and infection in pigs in the three main production systems. **Veterinary Research Communications** 40(2):81-88,

Giguère S (2013) **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. Atlanta: Ed. Wiley Blackwell p. 199-208.

Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology** 100:255–68.

Hirose F, Neto JS (2012) Utilização de medicação via água de bebida na suinocultura: aspectos práticos e econômicos. Simpósio Brasil Sul de Suinocultura (5.: 2012; Chapecó, SC). **Anais do V Simpósio Brasil Sul de Suinocultura e do IV Brasil Sul Pig Fair, 14 a 16 de agosto de 2012**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves.

Holst S, Yeske P, Pieters M (2015) Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed-to-wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure and medication. **Journal of Swine Health and Production** 23(6):321-330.

Main BW, Means JR, Rinkema LE, Smith WC, Sarazan RD (1996) Cardiovascular effects of the macrolide antibiotic, tilmicosin, administered alone or in combination with propranolol or dobutamine, in conscious unrestrained dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology** 19:225.

McClary DG, Loneragan GH, Shryock TR, Carter BL, Guthrie CA, Corbin MJ, Mechor, GD (2011) Relationship of in vitro minimum inhibitory concentrations of tilmicosin against *Manheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* and in vivo tilmicosin

treatment outcome among calves with signs of bovine respiratory disease. **American Journal of Veterinary Research** 57:1180.

Morgan JH, Aitken IA, Collins P, Burch DGS (1996) Prevention of experimentally-induced enzootic pneumonia in pigs using the novel compound SDZ PMD 296 (Econor – Sandoz Ltd). **Proceeding 14th International Pig Veterinary Society Congress**. Bologna, Italy, p. 433.

Opriessnig T, Mattei AA, Karuppannan AK (2021) Future perspectives on swine viral vaccines: where are we headed? **Porcine Health Management** 7:1.

Pallarés FJ, Lasa C, Roozen M, Ramis G (2015) Use of tylvalosin in the control of porcine enzootic pneumonia. **Veterinary Record Open** 2(1):e000079.

Paradis MA (2004) Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. **Canadian Journal of Veterinary Research** 68:7.

Pieters M, Cline GS, Payne BJ, Prado C, Ertl JR, Rendahl AK (2014) Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. **Veterinary Microbiology** 172(3-4): p. 575-580.

Shen J, Li C, Jiang H, Zhang S, Guo P, Ding S, Li X (2005) **Pharmacokinetics of Tilmicosin After Oral Administration in Swine** 66(6).

Stark K (2000) Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine- a literature review. **The Veterinary Journal** 159:37-56.

Sobestiansky J, Barcellos D (2007) **Doenças dos Suínos. 2ed.** Goiânia: Cênone Editorial.

Spinosa, H.S.; Gorniak, S.L.; Bernardi, M.M (2011) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 5 ed.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Stipkovits L, Miller D, Glavits R, Fodor L, Burch D (2001) Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasterurella multocida*, and

Actinobacillus pleuropneumoniae with various antibiotics. **Canadian Journal Veterinary Research** 65:213-222.

Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters, W.R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research** 61:1384–9.

Thacker EL, Minion FC (2012) **Mycoplasmosis. Diseases of Swine 10th**. USA: John Wiley and Sons Inc p. 779-797

Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters WR (2000) Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research** 61(11): 1384-1389.

Thacker EL, Minion FC (2010) **Mycoplasmosis**. In: Zimmerman, J. (Ed.), Diseases of Swine. Ames: Iowa State University Press pp. 779–797.

Zanella J (2006) Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos: situação da infecção no Brasil e como evitar a doença em nossos rebanhos. In: **Anais do I Simpósio UFRGS Sobre Produção, Reprodução e Sanidade Suína**. Porto Alegre, Brasil, pp.196-197, 2006.

¹Capítulo II - Estratégias quimioterápicas com Valnemulina, Tilmicosina e Tulatromicina para controle da infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos
Giovani M. Stingelin¹; Marina L. Mechler-Dreibi¹; Gabriel Y. Storino¹; Karina Sonálio¹; Henrique M. S. Almeida¹; Fernando A. M. Petri¹, Luís Guilherme de Oliveira¹

¹São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences (FCAV). Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

Resumo

Mycoplasma hyopneumoniae, é agente primário da Pneumonia Enzoótica Suína (PES). As vacinas disponíveis diminuem a manifestação clínica da enfermidade, mas não previnem a infecção. O presente estudo objetivou avaliar o uso de fármacos antimicrobianos na redução do impacto de *M. hyopneumoniae*. Para tal, foram selecionadas 32 fêmeas prenhes e suas leitegadas, que foram acompanhados do nascimento ao abate. Quatro grupos experimentais sendo três deles protocolos de medicação metafilática envolvendo tilmicosina, valnemulina e tulatromicina e um grupo controle comparando o efeito dos tratamentos frente à infecção por *M. hyopneumoniae* ao longo das fases. Ainda, índices de desempenho zootécnico foram registrados e os leitões foram avaliados quanto a ocorrência de tosse e submetidos periodicamente a colheita de suabe nasal e sangue, destinados à avaliação da excreção de *M. hyopneumoniae* e dos títulos IgG anti-*M. hyopneumoniae*, respectivamente. Ao abate, pulmões dos animais de todos os grupos foram avaliados e amostras colhidas para exame histopatológico e de qPCR para detecção de *M. hyopneumoniae*. Todos protocolos avaliados promoveram redução das lesões consolidação pulmonar quando comparado ao grupo controle. Indivíduos medicados com valnemulina apresentaram melhores resultados zootécnicos, menor mortalidade e baixa carga bacteriana no pulmão. Os resultados são promissores e podem indicar possíveis aliados no controle estratégico da infecção por *M. hyopneumoniae*.

Palavras-chave: leitões; doenças respiratórias; pneumonia enzootica; metafilaxia.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Antibiotics. ISSN 0021-8820

1. Introdução

Ocorrência de doenças respiratórias em suínos são multifatoriais apresentando como elemento principal os patógenos infecciosos, principalmente vírus e bactérias que atuam em sinergia e em coinfeções, promovendo o Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) [2]. É descrito que a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é causada de forma primária por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que ocasiona imunossupressão e predispõe à infecções por patógenos secundários [3], como a *Pasteurella multocida* [4]. Infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes em todo o mundo e resultam em prejuízos financeiros para a indústria de suínos. As perdas econômicas em decorrência das doenças respiratórias estão associadas aos custos com tratamento, vacinação, diminuição do desempenho e aumento da mortalidade [5].

A infecção por *M. hyopneumoniae* inicia-se a partir da adesão do microrganismos ao epitélio ciliado do trato respiratório dos suínos promovendo resposta inflamatória desordenada e crônica, com a modulação da resposta imune celular e humoral que predispõem a manutenção do patógeno por longos períodos no organismo dos animais infectados [2]. Em granjas, a fêmea reprodutora é a principal fonte de infecção do *M. hyopneumoniae*, expondo a leitegada ao patógeno de forma precoce durante a fase de maternidade. Os leitões infectados nas fases subsequentes atuam disseminando o patógeno e infectando outros indivíduos susceptíveis, fator que é potencializado pela mistura de lotes [6].

Vacinas contra *M. hyopneumoniae*, apesar de reduzirem sinais clínicos e lesões pulmonares, não previnem de forma completa a infecção, visto que a prevalência de indivíduos infectados é superior a 70% nos rebanhos comerciais, mesmo com vacinação [7], [8]. Levando em conta o efeito parcial de vacinas contra *M. hyopneumoniae* na indução de uma resposta imune efetiva, acredita-se que estratégias de controle envolvendo a aplicação de protocolos medicamentosos adequados, com moléculas antimicrobianas de alta eficácia contra ao patógeno, possam reduzir as vias de transmissão, incluindo: entre matrizes e leitões na fase de maternidade, e entre leitões nas fases de creche e também na terminação, minimizando o impacto da PES nos rebanhos comerciais.

Dentre os fármacos que não pertencem ao Grupo III (Quinolonas, Cefalosporinas, Polimixinas e Ácidos Fosfônicos), categoria de fármacos classificada pela OMS como último recurso para uso em animais [9], a valnemulina, a tilmicosina e tulatromicina são os compostos que comprovadamente são eficazes contra patógenos respiratórios em geral e possivelmente também são efetivos no controle da PES [10]–[12]. Por fim, tendo em vista a busca por alternativas no controle de *Mycoplasma hyopneumoniae* associadas à vacinação, que estejam em consonância com o uso consciente de antimicrobianos, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de diferentes protocolos medicamentosos estratégicos no controle da ocorrência de Pneumonia Enzoótica em suínos de criação intensiva. Ainda, fornecer dados a respeito de estratégia de tratamento medicamentoso metafilático com os antimicrobianos tilmicosina, valnemulina e tulatromicina frente a infecção por *M. hyopneumoniae* em suínos a campo.

2. Material e métodos

2.1. Propriedade em que o estudo foi conduzido

O presente estudo foi conduzido em uma granja comercial de ciclo completo de 450 matrizes localizada no município de Amparo da Serra, estado de Minas Gerais, com histórico prévio de doença respiratória em animais de creche (21 a 65 dias de vida) e terminação (70 a 150 dias de vida). Na propriedade, tanto fêmeas reprodutoras quanto leitões eram vacinados contra *M. hyopneumoniae* utilizando a vacina Respisure (Laboratório Zoetis - EUA). Além da adoção de vacina contra *M. hyopneumoniae* no protocolo vacinal das reprodutoras, as fêmeas também recebiam a vacina Farrowsure B Gold (Laboratório Zoetis - EUA) contra Parvovirose suína, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Leptospira* spp., a vacina Litterguard LT-C (Laboratório Zoetis - EUA) contra *E. coli* e *Clostridium perfringens* tipo C e a vacina Aradicator (Laboratório Zoetis - EUA) com toxoide de *Pasteurella multocida* tipo D, a *Pasteurella multocida* tipo D inativada e *Bordetella bronchiseptica* inativada. Os leitões eram vacinados também contra circovírus suíno tipo 2 pela vacina Ingelvac Circoflex (Laboratório Boehringer Ingelheim, Alemanha) e contra *Glaesserella parasuis* e *Pasteurella multocida*.

utilizando vacina autógena produzida por Laboratório Ipeve, Belo Horizonte, MG – Brasil.

2.2. Design experimental

O presente estudo consiste em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) tendo sido estabelecidos quatro grupos de oito fêmeas cada (G1-G4), totalizando 32 reprodutoras. Além das fêmeas, os grupos foram compostos por suas respectivas leitegadas as quais foram avaliadas do nascimento ao abate. Ao longo das fases, os leitões foram submetidos a diferentes protocolos de tratamento com antimicrobianos e avaliados periodicamente. Cada grupo de reprodutoras era formado por duas fêmeas de 1º parto (nulíparas) e por outras seis fêmeas de ordens de parto variadas de 2 a 9. As fêmeas de diferentes grupos foram mantidas em diferentes salas, sendo que indivíduos de um mesmo grupo foram mantidos em um mesmo galpão.

Ao nascimento, os leitões foram identificados com brincos e ao 3º dia de vida foram pesados para que nas fases seguintes fossem separados de acordo com os grupos definidos. Leitões com peso superior a 3,3Kg e inferior a 1,4Kg aos três dias de idade foram retirados do estudo de forma a uniformizar o peso e obter médias de peso aproximadas entre os grupos. O fornecimento de ração era realizado duas vezes ao dia e atendia às exigências nutricionais para suínos [13] e a água era fornecida *ad libitum*.

Os grupos formados pelas fêmeas e suas leitegadas foram submetidos a diferentes protocolos medicamentosos (Figura S1 – item 8, p. 52). O grupo 1 (G1) foi considerado grupo controle, pois foi submetido a um protocolo mínimo de tratamento quando comparado ao protocolo regularmente adotado na propriedade, visando apenas a manutenção dos índices produtivos e a prevenção de doenças entéricas. Os demais grupos, além de serem submetidos ao mesmo protocolo descrito para G1 foram submetidos também a um protocolo medicamentoso adicional.

Os quatro grupos foram caracterizados da seguinte forma: Grupo 1 (G1): oito fêmeas não-medicadas previamente ao parto. Os leitões de G1 (n = 89) receberam amoxicilina via ração na dose de 15 mg/Kg de peso vivo (FARMAXILIN®, Farmabase Saúde Animal, Brasil) e 120 ppm de halquinol (H-MAX®, Farmabase Saúde Animal, Brasil) durante os 14 primeiros dias de creche. Na fase de crescimento e terminação,

receberam ração com o melhorador de desempenho enramicina (Enramax[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil); Grupo 2 (G2): oito fêmeas medicadas via ração com valnemulina (Rovax[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) na dose de 10mg/Kg durante os sete dias prévios a data prevista para o parto. Os leitões do G2 (n = 90) receberam valnemulina na dose de 10 mg/kg, 15 mg/Kg de amoxicilina (FARMAXILIN[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) e 120 ppm de halquinol via ração (H-MAX[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) nos primeiros 14 dias de creche e receberam mais 14 dias de valnemulina na dose de 10 mg/kg no início da fase de crescimento; Grupo 3 (G3): oito fêmeas, medicadas pela via intramuscular com tulatromicina na dose de 2,5mg/Kg dose única, sete dias antes do parto. Os leitões de G3 (n = 94) foram medicados com 10mg/Kg de valnemulina, 15 mg/Kg de amoxicilina (FARMAXILIN[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) e 120 ppm de halquinol via ração (H-MAX[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) nos primeiros 14 dias de creche. No início da fase de crescimento, por 14 dias, receberam via ração 20mg/Kg de tilmicosina (HI-BAC[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil); Grupo 4 (G4): oito fêmeas foram medicadas via ração com valnemulina (Rovax[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) na dose de 5mg/Kg de peso vivo durante sete dias anteriores ao parto. Os leitões de G4 (n = 89) receberam valnemulina na dose de 5 mg/kg, 15 mg/Kg de amoxicilina (FARMAXILIN[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) e 120 ppm de halquinol via ração (H-MAX[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) nos primeiros 14 dias de creche e receberam mais 14 dias de valnemulina na dose de 5 mg/kg na fase de crescimento. O G2, G3 e G4, assim como no grupo controle, receberam o melhorador de desempenho enramicina (Enramax[®], Farmabase Saúde Animal, Brasil) nas rações de crescimento e terminação (dos 79 dias de idade até o abate) (Figura S1 – item 8, p. 52).

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp *Campus* de Jaboticabal – SP, sob protocolo n° 009149/18.

2.3. Colheita de amostras de soro sanguíneo

Do total de leitões nascidos de cada grupo de fêmeas, 12 indivíduos foram escolhidos aleatoriamente no desmame aos 24 dias, para que fossem submetidos a avaliação clínica e colheita de sangue a cada 21 dias até os 151 dias de idade,

totalizando seis pontos de colheita. As colheitas de sangue eram realizadas mediante punção da veia jugular, após antissepsia com álcool 70%, utilizando agulhas 25 x 8 mm e tubos colheita à vácuo (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA).

Os tubos contendo sangue foram imediatamente após as colheitas centrifugados a 1500 x g por 10 minutos (Centrifuge 5804 R, Eppendorf®, Alemanha). O volume de soro sanguíneo obtido foi aliquoteado em duplicata em microtubos plásticos estéreis de 2 mL, livres de RNase e DNase e armazenados a -20°C até o momento das análises laboratoriais.

Amostras de suabe nasal foram colhidas de cada um dos 12 indivíduos ao longo de todo o período do estudo a cada 21 dias para avaliação da excreção de *M. hyopneumoniae*. Para a colheita os animais foram contidos com uso de laço e suabes de fibra de rayon foram inseridos na cavidade nasal através do orifício de ambas as narinas realizando leve fricção sobre a mucosa nasal. Os suabes foram colhidos em duplicata e armazenados em microtubos plásticos estéreis de 2 mL, livres de RNase e DNase contendo PBS (pH 7.4), que foram por sua vez mantidos em freezer -80°C até o momento do processamento para realização da qPCR.

2.4. Contagem de tosse

Em cada um dos pontos de colheita de amostras, previamente à contenção física, os animais eram submetidos ao teste de tosse com o intuito de calcular o índice de pneumonia (IP), conforme descrito por Soncini e Madureira (1998) [14].

2.5. Desempenho zootécnico

Ao longo das fases o consumo de alimento foi registrado por meio da pesagem da quantidade fornecida e pesagem das sobras de ração presentes no comedouro após 24 horas. Com base no consumo de alimento e no ganho de peso foram estimados os valores de conversão alimentar para os indivíduos ao longo das fases [15]. O ganho de peso diário (GPD) foi calculado com base na pesagem periódica no início e término das fases.

2.6. Registro de mortalidade

A mortalidade de indivíduos ao longo do estudo foi contabilizada por fase considerando o período de creche (dos 25 aos 63 dias de idade), terminação (dos 64 dias até o abate) e do desmame até o abate (25 dias de idade até o abate). Em caso de registro de mortalidade a possível suspeita da *causa mortis* também foi relatada baseada no histórico, sinais clínicos e se necessário, exame necroscópico.

2.7. Abate dos animais - avaliação e colheita de amostras

Ao fim do período experimental, todos os leitões foram abatidos em frigorífico cujos métodos atendiam o estabelecido pela PORTARIA Nº 711, 1/11/1995 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [16]. Após a evisceração, o conjunto respiratório formado por traqueia e pulmão de 29 animais de G1, 23 animais de G2, 30 animais de G3, 30 animais de G4, foram identificados e separados na linha do abate.

Os pulmões dos indivíduos de todos os grupos foram avaliados quanto a presença e extensão das lesões pulmonares de consolidação. Cada lobo foi avaliado individualmente de forma a estimar a porcentagem de área afetada estabelecendo uma pontuação de 0 a 4, sendo 0 atribuído a lobos sem evidência lesão; 1: de 1 a 25% de comprometimento; 2: de 26 a 50%; 3: de 51 a 75% e 4 de 76 a 100% de comprometimento, conforme descrito na literatura [17].

Para o cálculo da área total lesada, a pontuação de cada lobo foi multiplicada pela porcentagem de contribuição do lobo em relação ao volume pulmonar total considerando os seguintes valores: lobo apical direito = 11%, lobo cardíaco direito = 11%, lobo diafragmático direito = 34%, lobo apical esquerdo = 6%, lobo cardíaco esquerdo = 6%, lobo diafragmático esquerdo = 27%, lóbulo intermediário = 5% [18]. O grau da lesão foi avaliada de acordo com a área total de pneumonia, usando a média de cada escore de lobo em relação à área pulmonar total para obter o índice para pneumonia (IPP) [17], [19]. Grupos com IPP médio de até 0,55 foram considerados livres de pneumonia (Grau 0). Os animais com IPP médios entre 0,56 e 0,89 obtiveram classificação intermediária (Grau 1), na qual ocorreu a presença de pneumonia. Os animais com IPP acima de 0,90 foram considerados muito afetados, com ocorrências graves de pneumonia (Grau 2).

Após a inspeção macroscópica dos pulmões, foram realizadas colheitas de lavado traqueobrônquico (LTB). Para a colheita, foram utilizadas lâminas de bisturi esterilizadas para realização de cortes transversais a 2 cm da bifurcação da traqueia. No local da incisão era inserido uma pipeta plástica esterilizada de 50 mL contendo 20 mL de PBS (pH 7,4). O volume de PBS contido na pipeta era totalmente despejado e o pulmão era gentilmente massageado auxiliando a perfusão do líquido na árvore brônquica, com o auxílio de uma pera, parte do volume, aproximadamente 15 mL, era recuperado e transferido para tubos estéreis tipo Falcon de 50 mL livres de Dnase e RNase e armazenados a -80°C até o momento da análise por qPCR.

Fragmentos de tecido pulmonar foram obtidos das extremidades dos lobos apicais. Dos lobos apicais que eventualmente apresentaram lesão de consolidação, fragmentos foram obtidos da região de transição entre tecido sadio e afetado. Fragmentos menores foram colhidos com o auxílio de lâminas de bisturi e pinças esterilizadas e acondicionados em microtubos plásticos estéreis de 2 mL e livres de DNase e RNase, destinados à realização de qPCR. Fragmentos maiores de aproximadamente 1 cm³ foram colhidos e armazenados em frascos coletores universais de 80 mL contendo formalina tamponada a 10% para posterior realização de análises histopatológicas. Amostras destinadas ao qPCR foram imediatamente mantidas em gelo seco e posteriormente transferidas para freezer -80°C onde permaneceram até o momento das análises.

Os fragmentos destinados as análises histopatológicas fixados em formalina tamponada a 10% foram processados para coloração por hematoxilina/eosina. As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz e as lesões microscópicas nos tecidos foram classificadas em cinco diferentes graus [20], sendo: 0 = ausência de lesão; 1 = lesões de pneumonia intersticial e/ou broncopneumonia catarral; 2 = infiltração leve ou moderada de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nas vias aéreas e alvéolos; 3 = hiperplasia linfoplasmocítica perivascular ou peribronquiolar, hiperplasia de pneumócitos tipo II e presença de edema nos alvéolos e 4 = as mesmas lesões de 3 mais a presença de nodos linfóides perivascular e peribronquiolar.

2.8. Detecção e quantificação de anticorpos por ELISA

A detecção e quantificação de anticorpos IgG anti-*M. hyopneumoniae* em soro sanguíneo foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Para detectar IgG Ab sérico, foi utilizado o kit comercial *M.hyo* Ab test (Idexx, EUA). O registro da absorbância foi realizado em um leitor de microplacas (iMark, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) sob um comprimento de 650 nm. As densidades ópticas médias (OD) para cada uma das amostras de teste foram relacionadas com a OD dos controles negativos e positivos ($CN\bar{x}$ - $CP\bar{x}$) a fim de calcular os valores A/P (amostra / razão positiva) de acordo com a fórmula: $A / P = (ODs - CN\bar{x}) / (CP\bar{x} - CN\bar{x})$. As amostras de soro foram consideradas positivas se $A / P > 0,3$.

2.9. Extração de DNA e realização de cPCR para o gene *gapdh*

A extração do DNA foi realizada pelo protocolo *in house* Tris-HCl [21]. Para amostras de LTB, foram realizadas centrifugações (Centrifuge 5804 R, Eppendorf®, Germany) a 13000 g a 4°C por 20 minutos previamente ao protocolo de extração de DNA [21]. Para extração das amostras de pulmão, foram usados 0,05 g de tecido pulmonar. Após a extração do DNA, as amostras foram armazenadas a - 20°C até a análise por qPCR. A mensuração da concentração de DNA das amostras foi feita por espectrofotometria, com auxílio do *ThermoScientific NanoDrop™ One Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific®, Wilmington, Estados Unidos), tendo como fator de exclusão as amostras que não atingiram a pureza de 1,8 a 2,0 no Proporção 260/280 para executar a técnica qPCR. Para descartar a presença de inibidores nas amostras de DNA extraídas e a ocorrência de falsos negativos na qPCR para *M. hyopneumoniae*, todas as amostras foram submetidas a uma PCR convencional [22] visando o gene endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*). Os produtos amplificados do gene *gapdh* com 437bp foram detectados após eletroforese horizontal em gel de agarose.

2.10. Detecção e quantificação de *M. hyopneumoniae* por qPCR

A análise de quantificação absoluta por qPCR foi usada para detectar o fragmento do gene p102 em fragmentos de pulmão e amostras de LTB. Para *M. hyopneumoniae*, os primers usados na reação foram baseados na sequência do gene

da proteína de adesão da bactéria p102. Todas as amostras foram testadas em duplicata e a reação qPCR foi otimizada a partir de um protocolo publicado anteriormente [23] adaptado [24]. As sequências de primers forward e reverse foram: p102-F-5'-AAGGGTCAAAGTCAAAGTC-3' e p102-R5'-AAATTAAAAGCTGTTCAAATGC-3' e a sonda de hidrólise 5'- FAM-AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-§BHQ2-3'.

Os resultados foram aceitos apenas para aqueles com desvio padrão menor ou igual a 0,5 ciclo, e os dados de quantificação foram utilizados apenas se a eficiência obtida estivesse entre 90% e 105%, caso contrário, as amostras eram retestadas em triplicatas. Como controle negativo nas reações de qPCR, foi usada água ultrapura estéril (*Nuclease-Free Water*, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) q.s.p. Diluições seriadas foram feitas para determinar a curva padrão gerada com diferentes concentrações de DNA sintético (gBlock®, IDT, EUA) contendo a sequência alvo (10^7 cópias/ μ L a 10^1 cópias/ μ L), que também foram utilizadas como controles-positivos. O DNA sintético foi diluído de acordo com as orientações do fabricante e mantido em concentração de estoque de 10^7 moléculas/ μ L.

A quantificação foi realizada por meio de diluições seriadas de 10 vezes (iniciando em 10^7 até 10^1 cópias/ μ L) de DNA sintético (GBlock®, IDT, Iowa City, IA, EUA) contendo o fragmento de 150 pb amplificado pelo par de primers usado no qPCR. Os dados de quantificação baseados na curva padrão gerada só eram validados se a eficiência da reação estivesse entre 90% e 105% [25]. Os ciclos foram realizados em um termociclador em tempo real CFX-96 (Biorad – EUA), nas seguintes configurações: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 15 s e um ciclo de extensão a 55,7°C por 1 min.

3. Análise estatística

Variáveis quantitativas e qualitativas foram analisadas e modelos foram construídos para avaliar os efeitos dos tratamentos na dinâmica da infecção, no desempenho zootécnico e no impacto da infecção na saúde respiratória. As variáveis numéricas contínuas de quantificação de *M. hyopneumoniae* no pulmão e LTB, títulos de IgG anti-*M. hyopneumoniae*, bem como dados de desempenho ao longo das fases: peso corporal, conversão alimentar, ganho e peso e dados de avaliação de saúde

respiratória (tosse, índice de pneumonia e consolidação pulmonar), foram analisados de forma descritiva e quanto aos critérios para aplicação de testes estatísticos paramétricos e não paramétricos, seguindo pressupostos para a aplicação de tais testes.

Comparações entre grupos foram realizados para quantificação de *M. hyopneumoniae* em suabe nasal por qPCR e para título de IgG em cada momento e para quantificação de anticorpos anti-*M. hyopneumoniae* no pulmão e no LTB. A análise de variância entre os grupos foi obtida e em seguida foram realizadas comparações entre médias por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$), e em caso de dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade, o teste de Kruskal-Wallis foi empregado ($p < 0,05$) para comparação entre as medianas, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn.

Análises de correlação foram realizadas para verificar a associação entre variáveis. Correlações entre variáveis de desempenho zootécnico em diferentes fases em função da quantificação *M. hyopneumoniae* foram realizadas, bem como foram avaliadas possíveis correlações entre quantificação de *M. hyopneumoniae* e de medidas de desempenho zootécnico em função dos títulos de anticorpos IgG anti-*M. hyopneumoniae*, de forma a analisar a influência da imunidade humoral contra o patógeno nos níveis de carga bacteriana pulmonar, na excreção, e no desempenho dos animais. As correlações foram avaliadas a partir de modelos analisados, em um primeiro momento, quanto aos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos e em seguida submetidos ao teste mais adequado: Correlação de Pearson (paramétrico) ou Spearman (não-paramétrico) ($p < 0,05$).

Por fim, diferenças entre as proporções de amostras positivas no qPCR para *M. hyopneumoniae*, proporção de amostras positivas na detecção de IgG anti-*M. hyopneumoniae*, foram analisadas pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Das demais proporções que envolveram múltiplas comparações (mortalidade, IPP, e tosse) foram obtidos os intervalos de confiança pelo intervalo de Wilson para estabelecer possíveis diferenças baseadas na amplitude do intervalo ao nível de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R Project for Statistical Computing [26] e da interface gráfica, R Studio®, e dos pacotes: agricolae [27]; lme4 [28]; amr [29], Emmeans [30] car [31], nortest [32], mass [33], ggplot2 [34].

4. Resultados

4.1 Quantificação de IgG no soro dos suínos ao longo do tempo

Amostras de soro dos 12 indivíduos de cada grupo foram obtidas ao longo do tempo e submetidas ao ELISA para detecção e quantificação de IgG anti-*M. hyopneumoniae* (Tabela 1). Diferenças significativas entre as médias de valor de S/P $\pm$ erro padrão (EP) foram observadas apenas aos 63 dias, onde o valor médio do G4 ($0,599 \pm 0,17$) não diferiu dos demais e o valor médio registrado para G2 ($0,997 \pm 0,15$) foi maior que os valores médios de G1 ($0,188 \pm 0,04$) e G3 ($0,183 \pm 0,04$) que não diferiram entre si. Nos demais pontos de colheita não foi constatada diferenças estatísticas. Aos 45 dias de idade, há uma diferença numérica com maior valor registrado para G4. Aos 93 dias de idade, numericamente há maior valor de S/P no G2 em relação aos demais grupos com tendência significativa quando comparado a G1 e G3 ($p = 0,06$). Aos 123 dias de idade G2 e G4 apresentaram maiores valores numericamente e aos 151 dias a média dos valores de S/P de G2 foi superior as demais (Figura 1).

Quando comparados os valores de S/P entre medidas repetidas ao longo do tempo para cada grupo, foi observado que para o grupo 1 aos 24 dias o título de anticorpo não diferiu dos demais. Aos 45 dias o título de anticorpos foi menor que aos 123 e 151 dias. Aos 151 dias não houve diferença quando comparado aos 45 dias e aos 63 dias, que por sua vez não diferiu dos demais pontos ($p = 1 \times 10^{-4}$). Para o grupo 2, as medianas de S/P registradas aos 123 e 151 dias foram maiores que as observadas aos 24 e 45 dias, enquanto aos 63 dias e aos 93 não foi constatado diferenças entre si nem em relação aos demais pontos ($p = 2,8 \times 10^{-5}$). No grupo 3 também foram observadas diferenças entre os valores observados aos 123 e 151 dias em relação aos 24 e 45 dias, enquanto os demais pontos não diferiram entre si nem dos demais ($p = 9,8 \times 10^{-5}$). Por fim, no grupo 4 os valores de S/P de 123 e 151 dias foi maior que aos 24, 45, 63 dias que não diferiram entre si, bem como aos 93 dias não houve diferenças em relação aos demais.

Tabela 1. Médias de valores de S/P *value* para IgG anti-*Mhyo* entre grupos ao longo do tempo para cada “*time-point*” (T) de T1 até T6 (151 dias de idade dos suínos para o G1, G2 e G3 e aos 145 dias de idade para o G4).

	Grupo	Media	Diferença*	Erro Padrão da Media	Valor de P
T1 (24 dias)	G1	0,318	a	0,143	0,235
	G2	0,099	a	0,035	
	G3	0,053	a	0,041	
	G4	0,256	a	0,141	
T2 (45 dias)	G1	0,067	a	0,025	0,27
	G2	0,073	a	0,024	
	G3	0,092	a	0,034	
	G4	0,237	a	0,129	
T3 (63 dias)	G1	0,188	b	0,045	2,3x10 ⁻⁵
	G2	0,997	a	0,149	
	G3	0,183	b	0,045	
	G4	0,599	ab	0,176	
T4 (93 dias)	G1	0,517	a	0,172	0,15
	G2	1,043	a	0,192	
	G3	0,530	a	0,188	
	G4	0,677	a	0,162	
T5 (123 dias)	G1	1,087	a	0,222	0,64
	G2	1,360	a	0,218	
	G3	1,154	a	0,194	
	G4	1,388	a	0,152	
T6 (151 dias)	G1	1,456	a	0,208	0,29
	G2	1,856	a	0,109	
	G3	1,693	a	0,195	
	G4	1,454	a	0,142	

*Letras iguais indicam que as *medias* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste paramétrico de Tukey,

Aos 45 dias de idade, o soro sanguíneo de nenhum indivíduo foi positivo para IgG anti- *M. hyopneumoniae*. Já no G2, nenhum animal foi positivo até os 63 dias de idade, momento de maior percentual de soroconversão do G2 nesse momento de colheita em relação aos outros grupos.

4.2 Detecção e quantificação de *Mycoplasma hyopneumoniae* por qPCR em suabe nasal

Foram coletados suabes nasais das oito porcas de cada grupo no 7º dia anterior ao parto (d-7) e no dia do parto (d0). Uma porca do G2 foi positiva com efeito Monte Carlo (Bustin et al., 2009), ou seja, a quantificação de DNA do *Mycoplasma hyopneumoniae* foi tão pequena em um dos testes na duplicata da análise que não foi possível quantificar. Era uma fêmea de primeiro parto e foi positiva no dia do parto. Uma porca do G3, segunda ordem de parto, no sétimo dia anterior ao parto (d-7) foi positiva também com efeito Monte Carlo. Não foi possível verificar diferença significativa entre os grupos embora aos 151 dias foi constatado uma tendência a significância entre G3 e G4 ($p = 0,08$).

Na tabela 2, é possível verificar as medianas das quantificações de *M. hyopneumoniae* nos leitões, entre grupos, ao longo do tempo para cada *time-point* (T) de T1 até T6 e na figura 1 é possível observar a porcentagem de indivíduos positivos ao longo do tempo para os diferentes grupos. Ao longo dos seis momentos, foram colhidas amostras dos mesmos 12 animais de cada grupo.

Em relação as comparações entre medidas repetidas ao longo do tempo, foi observado que apenas G1 apresentou diferenças entre as medianas de quantificação. Para G1 os valores de quantificação registrados aos 123 dias foram superiores em relação aos os valores observados aos 45, 63 e 93 dias, que por sua vez não diferiram entre si nem da quantificação registrada aos 151 dias.

Figura 1. Valor de média e percentual de animais sorologicamente positivos nos diferentes grupos (ELISA S/P *value*) para anticorpos IgG anti-*M. hyopneumoniae* e percentual de animais positivos no qPCR de suabe nasal.

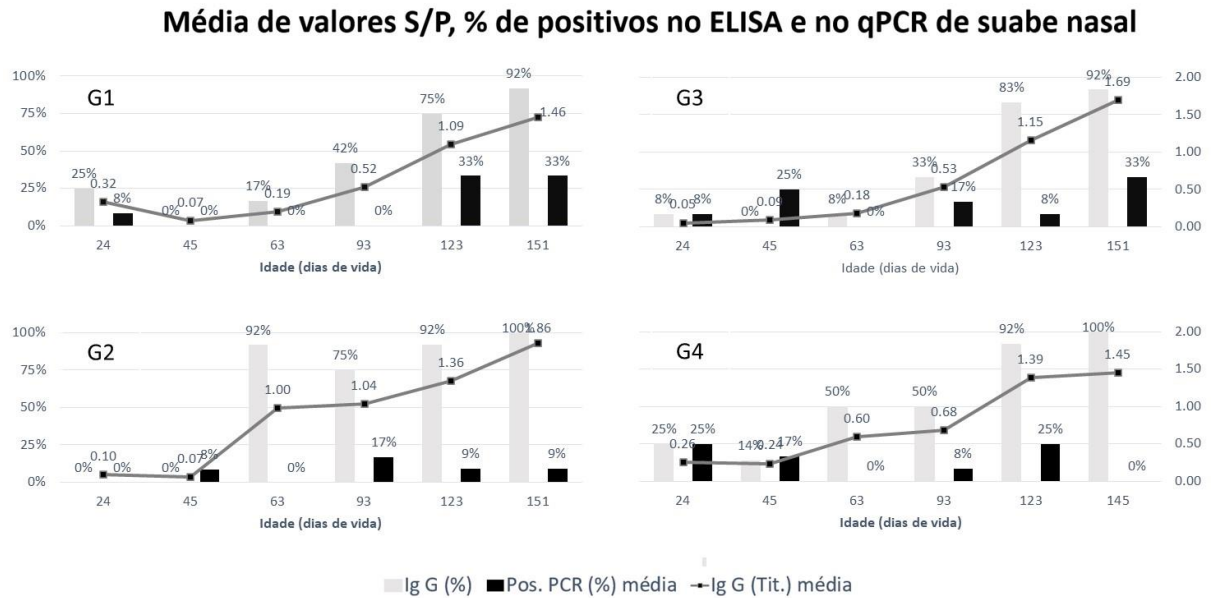


Tabela 2. Medianas das quantificações de *Mhyo* no suabe nasal entre grupos ao longo do tempo para cada “time point” (T) de T1 até T6 (151 dias de idade dos suínos para o G1, G2 e G3 e aos 145 dias de idade para o G4).

Pontos	Grupo	Mediana	Erro Padrão da Mediana	Diferenças*	valor de p
T1 (24 dias)	G1	0,00	3,08	a	0,27
	G2	0,00	0,00	a	
	G3	0,00	16,5	a	
	G4	0,00	31,5	a	
T2 (45 dias)	G1	0,00	0,00	a	0,14
	G2	0,00	11,6	a	
	G3	0,00	4,34X10 ⁵	a	
	G4	0,00	1,61	a	
T3 (63 dias)	G1	0,00	0,00	-	NA
	G2	0,00	0,00	-	
	G3	0,00	0,00	-	
	G4	0,00	0,00	-	

Continua na próxima página

T4 (93 dias)	G1	0,00	0,00	a	0,55
	G2	0,00	3,68X10 ²	a	
	G3	0,00	5,53	a	
	G4	0,00	67,6	a	
T5 (123 dias)	G1	0,00	25,6	a	0,13
	G2	0,00	23,8	a	
	G3	0,00	86,1	a	
	G4	0,00	23,3	a	
T6 (151 dias)	G1	0,00	3,18X10 ³	a	0,07
	G2	0,00	73,9	a	
	G3	0,00	1,93X10 ⁶	a	
	G4	0,00	0,00	a	

NA: Amostra negativa.

*Letras iguais indicam que as *Medianas* não diferem entre si ao nível de 0.05 pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

** Por não terem sido registradas detecções no período não foi possível obter valores de mediana, erro padrão, bem como realizar teste de comparação entre os grupos.

Seis animais de G1 foram positivos em algum momento considerando todos períodos de colheita, sendo que dois deles foram positivos com efeito Monte-Carlo [25]. Em G2, cinco animais foram positivos em algum momento de todos os períodos colhidos, sendo que dois deles apresentaram efeito Monte-Carlo. Em G3, 12 animais foram positivos, quatro deles foram positivos com efeito Monte Carlo. No G4, nove animais foram positivos, três deles apresentaram efeito Monte Carlo. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao número de amostras positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, nem em relação a quantificação. Em relação as amostras positivas de animais em diferentes idades, aos 63 dias de idade, foi o único período em que nenhum dos grupos apresentou animais positivos, por outro lado aos 123 dias de idade, todos os grupos apresentaram indivíduos positivos e o mesmo ocorreu no G1, G2 e G3 aos 151 dias de idade.

4.3. Avaliação dos indicadores sanitários

4.3.1. Teste de tosse

Periodicamente ao longo do estudo foram realizadas contagens de tosse para o cálculo índice de pneumonia (IP). Até os 63 dias de idade não foi observada

ocorrência de tosse em nenhum dos grupos. Aos 93 dias não foi registrada tosse em G1 e em G3, enquanto em G2 o IP foi de 0,39% em G4 de 1,15%. Aos 123 dias de idade os IP foram: G1 de 1,98%, em G2 de 0,39%, em G3 de 1,18% e em G4 de 5,75%. Aos 151 dias o IP em G1 foi de 2,03%, em G2 de 0,78%, em G3 de 0,80% e em G4 de 1,16%. Apesar das diferenças numéricas, não foi constatado diferença significativa entre os grupos ao nível de $p < 0,05$ pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

4.3.2. Registro de mortalidade

Em relação ao percentual de mortalidade, na fase de creche houve apenas a morte de um animal do G1 (1,11%), sem mortalidades nos demais grupos. Não há diferença estatística entre os grupos neste período. Na fase de terminação, morreram seis animais do G1 (6,74%), dois animais do G2 (2,3%), sete animais do G3 (7,69%) e um animal do G4 (1,15%).

Em G1, quatro dos seis animais que morreram apresentavam sinais clínicos respiratórios e dois deles, sinais clínicos de meningite. No G2, um animal morreu por torção intestinal e o outro por definhamento com comprometimento pulmonar e padrão de lesão intersticial no parênquima, característico de infecção por influenza. Já no G3, dois dos sete animais que morreram, tinham sinais clínicos de meningite, outros dois tinham sinais clínicos de pneumonia com comprometimento pulmonar à necropsia, e outros três animais morreram por causas não infecciosas. Por fim, no G4, somente um animal morreu na terminação com sinal clínico de pneumonia e com comprometimento pulmonar à necropsia.

Se considerarmos a mortalidade total desde o desmame até o abate, a mortalidade é numericamente superior no G1 (7,78%) e no G3 (7,69%) em relação ao G2 (2,3%) e ao G4 (1,15%), mas não há diferença significativa entre eles com base no intervalo de confiança pelo método de Wilson.

4.4. Avaliação dos indicadores zootécnicos

No desmame, G1 era composto por 91 leitões, G2 por 87 leitões, G3 era formado por 91 leitões e G4 por 87 leitões. Na tabela 3 é possível verificar as médias dos pesos dos diferentes grupos ao longo do tempo para cada ponto de mensuração,

de T1 até T6 (151 dias de idade dos suínos para o G1, G2 e G3 e aos 145 dias de idade para o G4).

Tabela 3. Peso ao desmame, saída de creche e na idade de abate dos quatro diferentes grupos.

Peso corporal	Grupo	Media	Erro Padrão da Media	Diferença	Valor de p
T1 (peso aos 25 dias)	G1	6,20	0,17	b	1x10 ⁻⁵
	G2	7,05	0,14	a	
	G3	6,01	0,14	b	
	G4	6,47	0,14	b	
T2 (peso aos 63 dias)	G1	20,64	0,42	b	7x10 ⁻⁶
	G2	22,42	0,40	a	
	G3	20,66	0,48	b	
	G4	23,35	0,43	a	
T3 (G1, G2 e G3 peso aos 151 dias, G4 peso aos 145 dias)	G1	107,18	1,50	b	8x10 ⁻⁵
	G2	113,33	1,28	a	
	G3	104,95	1,47	b	
	G4	103,42	1,86	b	
T3 (G4 peso estimado aos 151 dias)	G1	107,18	1,50	ab	8x10 ⁻³
	G2	113,33	1,28	a	
	G3	104,95	1,47	b	
	G4	108,29	2,34	ab	

*Letras iguais indicam que as *medias* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste paramétrico de Tukey.

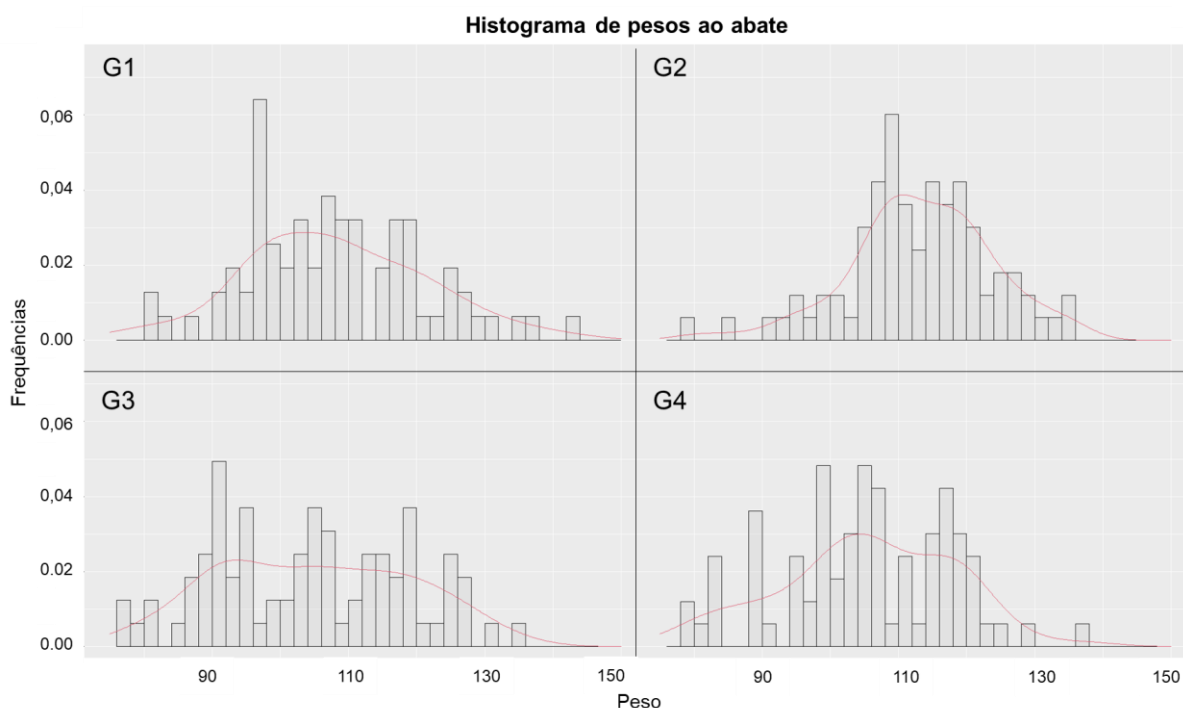
Os leitões de G2 desmamaram com maiores médias de peso (kg $\pm$ EP) (7,05 $\pm$ 0,17) quando comparado aos demais grupos que não diferiram entre si ($p < 0,001$). Na saída da creche aos 63 dias, aos indivíduos de G2 (22,42 $\pm$ 0,40) e G4 (23,35 $\pm$ 0,43) foram significativamente mais pesados do que o G1 (20,64 $\pm$ 0,42) ($p = 0,02$ e $p < 0,001$) e G3 (20,66 $\pm$ 0,48) ($p = 0,02$ e $p < 0,001$) que não diferiram entre si. Considerando o peso ao abate independentemente da idade visto que G1, G2 e G3 foram abatidos aos 151 dias de idade e G4 aos 145 dias de idade, o G2 (113,33 $\pm$ 1,28) foi mais pesado e os demais grupos (G2 x G1, $p = 0,04$; G2 x G3, $p = 0,01$ e G2 x G4, $p < 0,001$) não diferiram entre si.

Levando em conta que a média de GPD de G4 era de 0,974Kg no período dos 63 dias de idade até os 145 dias, aos 151 dias de idade, G2 (113,33 $\pm$ 1,28) seria

estatisticamente mais pesado do que G3 ($104,95 \pm 1,47$), mas não teria diferença de peso para o G1 ($107,18 \pm 1,50$) e G4 ($108,29 \pm 2,34$) que por sua vez não difeririam relação aos demais ($p < 0,05$).

Em relação a distribuição de peso dos animais dentro de cada grupo ao abate, G2 apresentou uma curva de distribuição normal mais uniforme com ligeiro desvio a direita, indicando a influência de maiores valores sobre a média (figura 2). Os coeficientes de variação em relação ao peso dos animais ao abate foram de 14% para G1, de 11% para G2, 13,5% para G3 e 13% para G4.

Figura 2. Histograma de peso dos grupos G1, G2, G3 aos 151 dias de idade e do G4 aos 145 dias de idade.



Em relação a avaliação do ganho de peso diário (GPD), na tabela 4 é possível verificar o desempenho dos diferentes grupos na fase de creche, terminação e dos 25 dias (desmame) até o abate, considerando 151 dias de idade para o G1, G2 e G3 e 145 dias de idade para o G4.

Na creche, o GPD ($g \pm EP$) do G4 ($0,45 \pm 0,009$) foi superior aos demais grupos que não diferiram entre si. Na terminação o GPD do G2 ($1,07 \pm 0,013$) foi superior em relação aos demais grupos que não diferiram entre si. O GPD do desmame ao abate

G2 ($0,87 \pm 0,01$) foi maior do que G1 ($0,82 \pm 0,012$) ($p = 0,01$) e G3 ($0,81 \pm 0,011$) ($p = 0,03$), e sem diferença para G4 ($0,84 \pm 0,012$).

Tabela 4. GPD dos quatro grupos nas fases de creche, terminação e do desmame até o abate.

Ganho de peso diário médio (Kg)	Grupo	Media	Erro Padrão da Media	Diferença*	Valor de P
Fase de creche	G1	0,39	0,008	b	4×10^{-6}
	G2	0,41	0,009	b	
	G3	0,39	0,010	b	
	G4	0,45	0,009	a	
Fase de terminação	G1	1,01	0,015	b	3×10^{-3}
	G2	1,07	0,013	a	
	G3	0,99	0,014	b	
	G4	1,01	0,015	b	
Entre 25d e 151d, considerando o G4 até 145d	G1	0,82	0,012	b	1×10^{-2}
	G2	0,87	0,010	a	
	G3	0,81	0,011	b	
	G4	0,84	0,012	ab	

*Letras iguais indicam que as *medias* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste paramétrico de Tukey.

Na avaliação de conversão alimentar no período de creche ($g \pm EP$), G4 ($1,69 \pm 0,042$) e G2 ($1,76 \pm 0,051$) tiveram a melhor conversão alimentar com diferença estatística quando comparado ao G1 ($2,01 \pm 0,047$) ($p < 0,001$ e $p = 0,006$) e G3 ($2,11 \pm 0,63$) ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) que não diferiram entre si. Na avaliação de conversão alimentar de terminação, G2 ($2,02 \pm 0,028$) foi melhor do que o G1 ($2,12 \pm 0,034$) ($p = 0,03$) e não teve diferença estatística para o G3 ($2,12 \pm 0,031$) e G4 ($2,03 \pm 0,033$). Já na avaliação de conversão alimentar do rebanho desde o desmame até o abate, o G2 ($1,97 \pm 0,025$) e G4 ($1,97 \pm 0,031$) teve melhores índices de conversão alimentar quando comparados ao G1 ($2,12 \pm 0,033$) ($p = 0,001$ e $p = 0,03$) e G3 ($2,14 \pm 0,031$) ($p < 0,001$ e $p = 0,01$), estes dois últimos não diferiram entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Conversão alimentar dos quatro grupos nas fases de creche, terminação e do desmame até o abate.

Conversão alimentar (CA) (Kg)	Grupo	Media	Erro Padrão da Media	Diferença*	Valor de P
Fase de creche	G1	2,01	0,047	a	5x10 ⁻⁹
	G2	1,76	0,051	b	
	G3	2,11	0,063	a	
	G4	1,69	0,042	b	
Fase de terminação	G1	2,12	0,034	a	4x10 ⁻²
	G2	2,02	0,028	b	
	G3	2,12	0,031	ab	
	G4	2,03	0,033	ab	
Entre 25d e 151d, considerando o G4 até 145d	G1	2,12	0,033	a	3x10 ⁻⁴
	G2	1,97	0,025	b	
	G3	2,14	0,031	a	
	G4	1,97	0,031	b	

*Letras iguais indicam que as *medias* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste paramétrico de Tukey.

4.5. Quantificação de *Mycoplasma hyopneumoniae* em lavado traqueobrônquico e tecido pulmonar por qPCR

Os fragmentos do lobo apical direito e amostras de LTB de 15 indivíduos de cada grupo colhidas ao abate foram submetidas a extração de DNA e ao qPCR para detecção e quantificação do *M. hyopneumoniae* (Tabela 6 e 7). A média dos valores de quantificação registrados em amostras de tecido pulmonar $\pm$ erro padrão (EP) de G2 ($6,74 \times 10^4 \pm 2,90 \times 10^4$) não diferiu dos demais, enquanto G1 ($1,34 \times 10^5 \pm 4,84 \times 10^4$) apresentou média superior as de G3 ($3,15 \times 10^4 \pm 9,72 \times 10^3$) e G4 ($2,41 \times 10^4 \pm 1,06 \times 10^4$) ($p = 0,02$), que vez não diferiram entre si. Em relação à quantificação de *M. hyopneumoniae* em amostras de LTB, não foi registrado diferenças significativas entre os grupos. Os valores de quantificação de *M. hyopneumoniae* no pulmão e nas amostras de LTB foram analisados para cada um dos grupos separadamente quanto a associação entre as variáveis pelo coeficiente de correlação de Kendall e apenas para G1 foi observada associação significativa ($p < 0,05$, Tau = 0,47).

Tabela 6. Quantificação média de *M. hyopneumoniae* em tecido pulmonar no abate dos quatro diferentes grupos.

Quantificação molecular de <i>M. hyo</i> em pulmão				
Grupo	Média	Erro Padrão da Média	Diferença*	Valor de P
G1	1,34x10 ⁵	4,84x10 ⁴	a	0,04
G2	6,74x10 ⁴	2,90x10 ⁴	ab	
G3	3,15x10 ⁴	9,72x10 ³	b	
G4	2,41x10 ⁴	1,06x10 ⁴	b	

Tabela 7. Quantificação média de *M. hyopneumoniae* no lavado traqueobrônquico no abate dos quatro diferentes grupos.

Quantificação molecular de <i>M. hyo</i> em LTB				
Grupo	Média	Erro Padrão da Média	Diferença**	Valor de P
G1	2,32x10 ⁶	9,33x10 ⁵	a	0,4
G2	5,67x10 ⁶	2,23x10 ⁶	a	
G3	3,57x10 ⁶	1,05x10 ⁶	a	
G4	3,33x10 ⁶	9,55x10 ⁵	a	

4.6. Avaliação das lesões pulmonares

4.6.2. Determinação do Índice para Pneumonia (IPP)

Os pulmões dos indivíduos de cada grupo foram avaliados individualmente registrando o grau de acometimento por lesões de consolidação de cada lobo para que a área total de comprometimento pulmonar pudesse ser calculada (tabela 8). Em relação a extensão de área com consolidação pulmonar não foi observado diferença significativa entre os grupos.

A prevalência de consolidação pulmonar de G1 foi de 96,55% (82,82 a 99,39%) e o índice para pneumonia (IPP) foi de 1,52. Para G2, a prevalência de consolidação pulmonar foi de 91,3% (73,2 a 97,58%) e, o índice para pneumonia (IPP) foi de 1,17. Para G3 a prevalência de consolidação pulmonar foi de 80% (62,69 a 90,5%) e, o índice para pneumonia (IPP) foi de 1,20. No G4 a prevalência de consolidação

pulmonar total foi de 93,33% (78,68 a 98,15%) enquanto o índice para pneumonia (IPP) foi de 1,27.

Tabela 8. Área de comprometimento pulmonar determinados por avaliação macroscópica.

Médias de área de consolidação pulmonar				
Grupo	Média	Erro Padrão da Média	Diferença*	Valor de P
G1	9,82	2,02	a	0,6
G2	6,98	1,31	a	
G3	7,47	1,57	a	
G4	7,69	1,27	a	

*Letras iguais indicam que as *medianas* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4.7. Análises histopatológicas

Parte dos pulmões avaliados foram submetidos a colheita de fragmentos que foram fixados em formalina 10% e posteriormente submetidos ao processamento de rotina para confecção de lâminas coradas por HE. As lâminas foram avaliadas quanto a ocorrência e grau das lesões microscópicas segundo a metodologia de Casalmiglia et al. (2000). Os pulmões amostrados foram provenientes dos mesmos indivíduos submetidos as colheitas de soro periódicas ao longo do estudo. Em se tratando de conjuntos de dados não paramétricos, as medianas dos graus de lesão pulmonar foram comparadas entre os grupos, contudo não foi evidenciada diferença significativa entre os valores (Tabela 9).

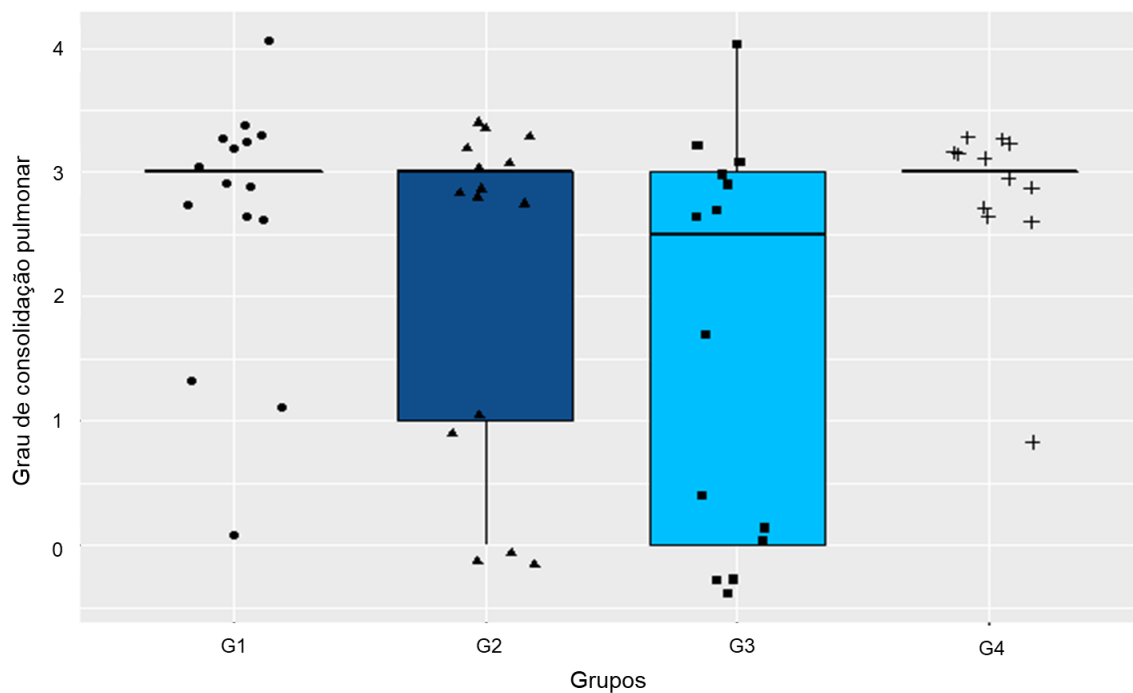
Numericamente, G1 e o G4 tiveram o maior número de animais na classificação 3, 11 pulmões de cada grupo, e também foram os grupos com menor número absoluto de pulmões classificados com graus abaixo de 2. O G3 foi o grupo com maior número de pulmões sem nenhum tipo de lesão (grau 0) (Figura 3).

Tabela 9. Mediana do grau de lesão dos pulmões coletados no frigorífico no exame histopatológico.

Valores de mediana para os graus de lesão				
Grupo	Mediana	Erro Padrão da Mediana	Diferença*	Valor de P
G1	3,00	2,60	a	0,13
G2	3,00	2,13	a	
G3	2,50	1,71	a	
G4	3,00	2,83	a	

*Letras iguais indicam que as *medianas* não diferem entre si ao nível de 0,05 pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Figura 3. Graus de lesão entre os grupos na análise histopatológica.



5. Discussão

Nossos resultados mostraram que apenas 6,25% (2/32) fêmeas reprodutoras estavam comprovadamente excretando *M. hyopneumoniae* nos dias anteriores ao parto, apesar do histórico de alta prevalência de *M. hyopneumoniae* na propriedade em que o estudo foi conduzido. É possível, contudo, que o número de reprodutoras

positivas tenha sido subestimado visto que a excreção em indivíduos positivos é intermitente [35]. Uma avaliação semelhante conduzida em um rebanho vacinado constatou que apenas 2,3% das fêmeas reprodutoras, no momento da amostragem, apresentavam excreção de *M. hyopneumoniae* [36].

Em rebanhos de reprodutoras a medicação com tivalosina, macrolídeo semi-sintético, antes do parto demonstrou resultados positivos na redução de prevalência do *M. hyopneumoniae* [37]. No presente estudo não foi evidenciado diferenças significativas entre os grupos em relação a quantificações de *M. hyopneumoniae* em amostras de suabe nasal, nem em relação a prevalência de indivíduos positivos. Contudo, deve-se levar em conta a particularidade do suabe nasal que apesar de indicar a excreção de *M. hyopneumoniae*, tem limitações quando utilizado para determinar a prevalência de indivíduos positivos no rebanho devido ao caráter de excreção intermitente do patógeno [38].

Ao desmame, apenas em G2 não foram observados indivíduos positivos para *M. hyopneumoniae* em amostras de suabe nasal, enquanto nos demais a prevalência variou de 8 a 25%. Como descrito por Fano et al. (2007) [39] a porcentagem de indivíduos positivos ao desmame pode ser correlacionada com a ocorrência de lesões pulmonares ao abate. No presente estudo foi observado que as médias das porcentagens de área pulmonar com lesões de consolidação variaram de 91,30% (G2) a 96,55% (G1) enquanto o IPP variou de 1,17 (G2) a 1,52 (G1). Embora não tenha sido demonstrado a correlação entre os dados de excreção e lesões pulmonares ao abate, os menores valores numéricos observados em G2 são possíveis indicadores de que o impacto da PES tenha sido menor, o que se comprovou ao observar resultados dos índices zootécnicos.

Próximo aos 120 dias de idade em granjas com animais infectados por *M. hyopneumoniae*, é relatado pico dos sinais clínicos, evidenciado pela ocorrência de tosse em indivíduos infectados [20]. No presente estudo, aos 123 dias as porcentagens de tosse variaram entre 0,39% no G2 e 5,75% no G4, contudo, apesar da notável diferença numérica, não foi possível determinar diferença significativa com base no intervalo de confiança, provavelmente devido ao tamanho amostral. Também aos 123 dias, a porcentagem observada de indivíduos positivos para *M. hyopneumoniae* entre os grupos variou de 9% em G2 a 33% em G1, demonstrando um

indício de que direta ou indiretamente a ocorrência de tosse e a prevalência de indivíduos positivos possam estar associados e que de fato houvesse uma diferença real em relação ao impacto da PES entre os grupos.

Se comparadas com estudos a campo, a incidência de tosse foi baixa para todos os grupos do estudo [40]. Somente a partir dos 93 dias de idade foi possível evidenciar a ocorrência de tosse em todos os grupos. Ao analisar os dados de amostras positivas e quantificação de *M. hyopneumoniae* de amostras de suabe nasal, bem como a contagem de tosse, observou-se que os dados, com base em suas características e na análise de estatística descritiva, não atenderam aos pressupostos para aplicação de testes paramétricos, o que diminui consideravelmente as chances de detectar efeitos significativos entre os tratamentos.

Nossos achados indicam um aumento considerável na prevalência de animais positivos aos 123 dias de idade no G1 (33%), G3 (33%) e no G4 (25%) com 151 dias de idade. O G2 foi o único grupo onde a positividade não aumentou consideravelmente e atingiu o máximo de 17% dos suínos positivos com 93 dias de idade, provavelmente pelo fato do tratamento estratégico com dose terapêutica de valnemulina na entrada da terminação, dos 64 aos 78 dias de idade ter reduzido a pressão de infecção e transmissão do patógeno entre os animais do grupo. Em granjas em que antibióticos foram retirados durante a fase de terminação, foi observado uma ocorrência de até 95.60% de animais positivos para *Mycoplasma* spp. [41].

Ainda, em relação a quantificação de *M. hyopneumoniae* no tecido pulmonar, G1 apresentou uma quantificação superior a G3 e G4 que por sua vez não diferiram entre si e nem diferiram de G2. Em relação a quantificação de *M. hyopneumoniae* no lavado traqueobrônquico (LTB), não houve diferença entre os grupos. Modelos para analisar a correlação entre a quantificação do *M. hyopneumoniae* no LTB e pulmão foram testados resultando em correlação direta significativa entre as variáveis ($p = 0,01$ e $\text{Tau} = 0,46$) somente para G1.

Acerca das lesões histopatológicas, três pulmões do G1 (20%), um pulmão do G2, (6,66%), um pulmão do G3 (7,14%) e um pulmão do G4 (8,33%) apresentaram lesões sugestivas de PES, reiterando que os grupos tratados possuem menor incidência de coinfeções, possivelmente pelo maior controle do *M. hyopneumoniae*.

Em relação a soropositividade dos leitões, os resultados das análises sorológicas mostraram que 8% dos indivíduos dos grupos G1 e G3 e 25% dos leitões do G4 apresentaram positivos até os 24 dias de vida, o que provavelmente se deve à imunidade passiva que pode durar até os 28 dias. Aos 45 dias de idade, momento em que as duas doses da vacina para *M. hyopneumoniae* já haviam sido aplicadas, nenhum dos indivíduos dos grupos G1, G2 e G3 apresentavam níveis de anticorpos acima do limiar de detecção, e 14% dos leitões do G4 eram positivos para a presença de IgG anti-*M. hyopneumoniae*, o que pode estar associado ao início da soroconversão, estando de acordo com Wilson *et al* [42], que relatou que anticorpos maternos podem estar presentes até a quarta semana de vida dos leitões.

Aos 45 dias, foi observado um período de ausência de anticorpos em todos os grupos e a partir dos 63 dias de vida foram observados animais soropositivos em todos os grupos, evidenciando um possível efeito da vacinação nos indivíduos após a aplicação da segunda dose da vacina. Quando comparado o perfil de soroprevalência ao longo do tempo entre os grupos observa-se que G1, G3 e G4 apresentam padrões semelhantes com até 50 % dos indivíduos com níveis de IgG anti - *M. hyopneumoniae* e aumento gradativo da porcentagem até os 150 dias, enquanto em G2, 91.66% dos indivíduos eram positivos aos 63 e as proporções se mantiveram elevadas até o abate. É possível que a ação efetiva da valnemulina frente aos patógenos respiratórios dos indivíduos possa ter propiciado uma melhora geral na saúde respiratória, contribuindo para uma melhor resposta imune nos animais do G2.

Não existem evidências que níveis de anticorpos IgG anti-*M. hyopneumoniae* tenham relação com como um efeito protetivo contra a infecção [43]. Estudos evidenciaram resultados benéficos em relação a vacinação de fêmeas reprodutoras, embora não seja possível determinar se os resultados positivos sobre os leitões são em decorrência dos anticorpos maternos ou de linfócitos específicos contra o patógeno, transferidos pelo colostro [44]. Levando em consideração o fato de que apenas G2 não tenha apresentado indivíduos soropositivos aos 24 dias de vida, é possível que a medicação das reprodutoras com valnemulina tenha sido efetivo no controle da infecção por *M. hyopneumoniae*, o que conseqüentemente, levou a uma ausência de soroconversão por parte desses indivíduos, levando a não transferência de anticorpos aos leitões por meio do colostro.

Estudos em animais tem relatado o potencial de modulação da resposta imune por parte de macrolídeos, alterando concentrações de determinadas células de defesa e regulando a liberação de citocinas [45]. Um perfil semelhante também foi observado para valnemulina que também apresentou efeito modulador sobre macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos [11]. No presente estudo contudo, por não terem sido avaliados os perfis de citocina e pelo fato de não ter sido conduzido em ambiente controlado, não é possível comprovar que de fato os antibióticos apresentaram ação de modulação da resposta imune. Apesar disso, foram observadas evidências de diferenças entre os tratamentos, principalmente considerando o desempenho dos indivíduos.

A medicação do G3 na entrada da recria foi realizada com tilmicosina, esse fármaco tem amplo espectro de ação para patógenos respiratórios, porém, a capacidade de penetração da tilmicosina na barreira hematoencefálica é baixa [46] e o MIC para o *Streptococcus suis* é elevado, superior a $>128 \mu\text{g/ml}$ [47], portanto, essa molécula não possui espectro de ação farmacocinético para o *S. suis*, o que pode explicar a elevada ocorrência de mortalidade por meningite nos indivíduos desse grupo. A medicação metafilática com valnemulina na entrada da recria no G2 e G4 culminou com a ausência de ocorrência de meningite estreptocócica nos leitões em fase de recria e terminação.

Na fase de creche, houve um alto desempenho do G4, com um GPD de 0,450Kg, superior estatisticamente aos outros grupo (G1, G2 e G3), que não diferiram entre si. Com a recuperação de G4 (23,35Kg) na fase de creche, o peso aos 63 dias de idade (saída de creche) resultou em uma ausência de diferença significativa em relação a G2 (22,42Kg) ao nível de ($p < 0,05$). Apesar de não terem sido realizadas pesagens aos 145 dias, é possível que G4, com base no GPD de terminação fosse superior aos demais grupos. De forma contrária ao planejado inicialmente, o abate de G4 teve de ser antes que os demais, aos 145 dias de idade, devido a uma necessidade logística imposta pelo frigorífico comprador dos animais. Levando em conta o ganho de peso médio durante a fase de crescimento e terminação para G4 e estimando o peso aos 151 dias, os resultados indicariam que G2 seria superior estatisticamente ao G3, mas não seria superior ao G1 e G4, que também não teriam diferença entre si ao nível de ($p < 0,05$).

Considerando ganho de peso médio diário dos 63 aos 151 dias de idade, o G2 (1,070 Kg) foi mais eficiente e teve desempenho significativamente melhor do que G1 (1,010 Kg), G3 (0,99 Kg) e G4 (1,010 Kg) que não diferiram entre si. Porém, se consideramos o ganho de peso diário do desmame até a idade de abate, o G2 (0,870Kg) foi significativamente superior ao G1 (0,820Kg) e ao G3 (0,810Kg), e não diferiu do G4 (0,840Kg), que por sua vez não diferiu do G1 e G3. Embora nesse cenário, o abate precoce de indivíduos de G4 possa ter comprometido os resultados de conversão e ganho de peso médio, os resultados de G2 e G4 dão indícios que os grupos possam ter apresentado melhores resultados em virtude do antimicrobiano em comum, a valnemulina. Rebanhos positivos para *M. hyopneumoniae* e com alta pressão de infecção tem conversão alimentar pior em 0,080 Kg quando comparada a rebanhos livres [5]. O G2 não era negativo para *M. hyopneumoniae*, mas do ponto de vista zootécnico apresentou bons resultados, assim como os indivíduos de G4.

Em relação a conversão alimentar, no período de creche G2 (1,760Kg) e G4 (1,690Kg) foram significativamente melhores que os demais enquanto na fase de terminação, dos 63 dias de idade até o abate, o G2 teve conversão alimentar estatisticamente melhor (1,970Kg) do que o G1 (2,120Kg), embora não tenha diferido significativamente de G3 (2,120Kg) e G4 (2,030Kg). O G1, G3 e G4 não diferiram entre si. Se considerarmos a conversão alimentar do desmame até o abate, o G2 (1,970Kg) e o G4 (1,970Kg) foram os grupos mais eficientes estatisticamente do que o G1 (2,120Kg) e o G3 (2,140Kg) ao nível de ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Uma importante observação deste estudo, alinhada com o conceito de saúde única e com a preocupação do uso estratégico e prudente de antimicrobianos, foi que no G1, foram mantidos níveis mínimos de uso de antimicrobianos, contando apenas com moléculas destinadas ao controle de doenças entéricas mais a Amoxicilina no desmame, visto que a retirada completa dos antimicrobianos deve ser devidamente planejada e associada a outras medidas sanitárias para minimizar o impacto sobre os animais, contudo, devido aos surtos de meningite houve a necessidade de aplicar um novo pulso de amoxicilina, elevando a quantidade total de antimicrobianos administrados aos indivíduos do G1, totalizando 340mg/Kg.

Em G3, no total, foram administrados 178 mg de antimicrobianos por Kg animal. No protocolo medicamentoso desse grupo, no início da fase de terminação, um pulso

de tilmicosina foi usado, e essa molécula não possui espectro de ação para *S. suis*. E mesmo a granja não apresentando histórico de meningite estreptocócica, animais do grupo também vieram a óbito em decorrência de meningite. Por fim, G3 também recebeu mais um pulso de amoxicilina e a quantidade de mg de antimicrobiano por Kg de suíno abatido foi de 437mg.

No G2, 116mg de antimicrobianos por Kg de suíno abatido foram administradas, e no G4, 102 mg de antimicrobianos por Kg de suíno abatido foram administradas.

As pleuromutilinas têm ação superior aos macrolídeos contra *Mycoplasma* sp. e dentro desse grupo de quimioterápicos antimicrobianos a valnemulina é relatada como sendo aproximadamente 30 vezes mais efetiva que a tiamulina contra *Mycoplasma* sp. *in vitro* [48].

Quando administrada via ração em suínos a valnemulina atinge o pico de concentração plasmática em até 4 horas e apresenta alta biodisponibilidade no pulmão [49], [50] onde é comprovadamente eficaz contra *Mycoplasma* [51]. Embora existam poucos estudos avaliando a eficácia da valnemulina no controle de doenças respiratórias considerando as características da molécula, é descrito que possíveis resultados positivos possam ser alcançados ao utilizar a molécula em protocolos medicamentosos estratégicos voltados para o controle do *M. hyopneumoniae* e por consequência, da PES. Contudo, tanto em relação aos macrolídeos quanto pleuromutilinas faltam estudos para comprovar a eficácia dos medicamentos frente ao complexo de doenças respiratórias envolvendo o *M. hyopneumoniae* em condições reais a campo.

É necessário ressaltar que estudos fora de um ambiente controlado envolvem inúmeras variáveis que muitas vezes não são possíveis de serem mensuradas ou categorizadas, o que dificulta estabelecer associações principalmente quando são considerados apenas dois fatores em medidas de associação e correlação, que são as únicas alternativas do ponto de vista estatístico quando pressupostos para análises mais robustas não são alcançados.

Apoiado nos dados obtidos com o presente estudo, é possível concluir que o uso estratégico de antimicrobianos isoladamente pode não ser suficiente para estabelecer o controle da PES, embora apresente resultados favoráveis do ponto de

vista produtivo. Além disso, podemos concluir que o uso de moléculas antimicrobianas de alta eficácia possibilitam reduzir a quantidade de medicamentos administrados, mantendo, e inclusive melhorando a produtividade. Portanto, é importante ressaltar a necessidade de combinar medidas sanitárias baseadas em dados técnicos e científicos e a importância do monitoramento constante dos rebanhos para que a máxima eficácia no controle e possivelmente na erradicação dos patógenos respiratórios sejam alcançadas.

6. Conclusão

Existem evidências de que melhores resultados em relação ao desempenho dos indivíduos foram alcançados graças a pulsos medicamentosos e que a valnemulina seja mais efetiva que as demais moléculas avaliadas em protocolos medicamentosos metafiláticos. Os protocolos que utilizaram 5 e 10mg/Kg de valnemulina em fêmeas e leitões demonstraram ser os mais promissores em aliar a manutenção e melhoria da produtividade possibilitando a redução da quantidade total de antimicrobianos administrados aos animais. Ainda, pode estar relacionado a uma melhoria da saúde respiratória.

7. Agradecimentos

À Farmabase Saúde Animal Ltda pelo suporte financeiro e agradecemos aos membros do Laboratório de Medicina de Suínos – Unesp/FCAV pelo apoio com as colheitas e auxílio com avaliações laboratoriais, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil.

8. Contribuição dos autores

Todos os autores do presente manuscrito contribuíram igualmente em todas as etapas com a idealização do estudo, execução, análise e redação.

9. Conflito de interesses

G.M.S é colaborador da empresa Farmabase Saúde Animal, Brasil.

7. Referências Bibliográficas

1. Thacker, E.L.; Minion, F.C. *Mycoplasmosis. Diseases of Swine*, 10th ed.; John Wiley and Sons Inc.: USA, 2012.
2. Sibila, M.; Pieters, M.; Molitor, T.; Maes, D.; Haesebrouck, F.; Segalés, J. Current Perspectives on the Diagnosis and Epidemiology of Mycoplasma Hyopneumoniae Infection. *Vet. J.* **2009**, *181* (3), 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020>.
3. STÄRK, K.D.C. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine—A Literature Review. *Vet. J.* **2000**, *159* (1), 37–56. <https://doi.org/10.1053/tvjl.1999.0421>.
4. Holst, S.; Yeske, P.; Pieters, M. Elimination of Mycoplasma Hyopneumoniae from Breed-to-Wean Farms: A Review of Current Protocols with Emphasis on Herd Closure and Medication. *J. Swine Heal. Prod.* **2015**, *23* (6), 321–330.
5. Maes, D.; Segales, J.; Meyns, T.; Sibila, M.; Pieters, M.; Haesebrouck, F. Control of Mycoplasma Hyopneumoniae Infections in Pigs. *Vet. Microbiol.* **2008**, *126* (4), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.008>.
6. Pallarés, F.J.; Lasa, C.; Roozen, M.; Ramis, G. Use of Tylvalosin in the Control of Porcine Enzootic Pneumonia. *Vet. Rec. Open* **2015**, *2* (1). <https://doi.org/10.1136/vetreco-2014-000079>.
7. Fano, E.; Pijoan, C.; Dee, S. Mycoplasma Hyopneumoniae Prevalence at Weaning as a Predictor of the Group's Subsequent Mycoplasma Status. In *Allen D. Leman Swine Conference*; 2005; pp 109–113.
8. EMA. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 30 European Countries in 2015. EMA/184855/2017. *Seventh ESVAC Rep.* **2017**, 184.
9. Huang, Z.; Hu, Z.; Zheng, H.; Xia, X.; Gu, X.; Shen, X.; Yang, H.; Ding, H. The PK/PD Integration and Resistance of Tilmicosin against Mycoplasma Hyopneumoniae. *Pathogens* **2020**, *9* (6), 487. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060487>.
10. Zhang, X.; Li, H.; Feng, H.; Xiong, H.; Zhang, L.; Song, Y.; Yu, L.; Deng, X. Valnemulin Downregulates Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and Cytokine Production via Inhibition of NF-KB and MAPK Activity. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9* (7–8), 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.02.018>.
11. Nutsch, R.G.; Hart, F.J.; Rooney, K.A.; Weigel, D.J.; Kilgore, W.R.; Skogerboe, T.L. Efficacy of Tulathromycin Injectable Solution for the Treatment of Naturally Occurring Swine Respiratory Disease. *Vet. Ther.* **2005**, *6* (2), 214–224.
12. Rostagno, H.S. *Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*, 3rd ed.; UFV/DZO, E., Ed.; 2011.
13. SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S. da; SESTI, L.A.C. *Suinocultura Intensiva: Producao, Manejo e Saude Do Rebanho.*, 1st ed.; Embrapa

Suíños e Aves: Brasília, 1998.

14.Ramirez, A.; Karriker, L.A. Herd Evaluation. *Dis. Swine* **2019**, 3–16.
<https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch1>.

15.Brazil. *Portaria n 711 - Normas Técnicas de Instalações e Equipamentos Para Abate e Industrialização de Suínos*; 1995; p 60,98.

16.PIFFER, I. A.; BRITO, J.R.F. *Descricao de Um Modelo Para Avaliação e Quantificação de Lesões Pulmonares de Suínos e Formulação de Um Índice Para Classificação de Rebanhos*; Embrapa Suínos e Aves: Concórdia-SC, 1991.

17.Brito, J.R.; Piffer, I.A.; Sobestiansky, J.; Brito, M.A. V. Vacinação Com Bordetella Bronchiseptica e Pasteurella Multocida, Associada a Alterações Do Manejo, No Controle Da Rinite Atrófica Dos Suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* **1993**, 183–191.

18.Davies, P.R.; Bahnson, P.B.; Grass, J.J.; Marsh, W.E.; Dial, G.D. Comparison of Methods for Measurement of Enzoitic Pneumonia Lesions in Pigs. *Am. J. Vet. Res.* **1995**, 56 (6), 09–14.

19.Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Bosch, G.J. Profiling Mycoplasma Hyopneumoniae in Farms Using Serology and a Nested PCR Technique. *J. Swine Heal. Prod.* **1999**, 7(6), 263-268.

20.Kuramae-Izioka, E.E. A Rapid, Easy and High Yield Protocol for Total Genomic DNA Isolation of Colletotrichum Gloeosporioides and Fusarium Oxysporum. *Unimar* **1997**, 13 (3).

21.Birkenheuer, A.J.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia Gibsoni (Asian Genotype) and B. Canis DNA in Canine Blood Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, 41 (9), 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.

22.Fourour, S.; Fablet, C.; Tocqueville, V.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Eveno, E.; Kempf, I.; Marois-Créhan, C. 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 Enzoitic Pneumonia-like Lesions in Slaughtered Pigs. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, 125 (2), 345–355. <https://doi.org/10.1111/jam.13770>.

23.Almeida, H.M.S.; Mechler-Dreibi, M.L.; Sonálio, K.; Ferraz, M.E.S.; Storino, G.Y.; Barbosa, F.O.; Maes, D.; Montassier, H.J.; de Oliveira, L.G. Cytokine Expression and Mycoplasma Hyopneumoniae Burden in the Development of Lung Lesions in Experimentally Inoculated Pigs. *Vet. Microbiol.* **2020**, 244, 108647.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108647>.

24.Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, 55 (4), 611–622.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

25. Ripley, B.D. The R Project in Statistical Computing. *MSOR Connections. MSOR Connect. Newsl. LTSN Maths, Stats OR Netw.* **2001**, 1 (1), 23–25.

26. de Mendiburu, F.; de Mendiburu, M.F. Package ‘Agricolae.’ *R Packag. Version* **2019**, 1–2.

27. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4. *arXiv Prepr. arXiv* **2014**, No. 1406.5823.

28. Gelman, A.; Su, Y.-S.; Yajima, M.; Hill, J.; Pittau, M.G.; Kerman, J.; Zheng, T.; Dorie, V. Package ‘Arm.’ *R Top. Doc.* **2020**.

29. Lenth, R.; Lenth, M.R. Package ‘Lsmeans.’ *Am. Stat.* **2018**, 34(4), 216–221.

30. Fox, J. The car Package.

31. Gross, J.; Ligges, U. Package ‘Nortest.’ *Five omnibus tests Test. Compos. hypothesis Norm.* **2015**.

32. Ripley, B.; Venables, B.; Bates, D.M.; Hornik, K.; Gebhardt, A.; Firth, D.; Ripley, M. Package ‘Mass.’ *Cran r* No. 538, 113–120.

33. Wickham, H.; Wickham, M.H. The ggplot package.

34. Pieters, M.; Pijoan, C. Detection Pattern of Mycoplasma Hyopneumoniae DNA in Nasal Swabs. In *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*; Copenhagen, Denmark, 2006; p 209.

35. Takeuti, K.L.; de Barcellos, D.E.S.N.; de Lara, A.C.; Kunrath, C.F.; Pieters, M. Detection of Mycoplasma Hyopneumoniae in Naturally Infected Gilts over Time. *Vet. Microbiol.* **2017**, 203, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.025>.

36. Roozen, M.; Kaptur, R.; Rosener, D.; Marco, E. Recent Experiences with Tylvalosin (Aivlosin®) Intervention for the Eradication of Mycoplasma Hyopneumoniae in Commercial Swine Operations. In *AASV*; Dallas, Texas, 2014; pp 479–480.

37. Fablet, C.; Marois, C.; Kobisch, M.; Madec, F.; Rose, N. Estimation of the Sensitivity of Four Sampling Methods for Mycoplasma Hyopneumoniae Detection in Live Pigs Using a Bayesian Approach. *Vet. Microbiol.* **2010**, 143 (2–4), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.001>.

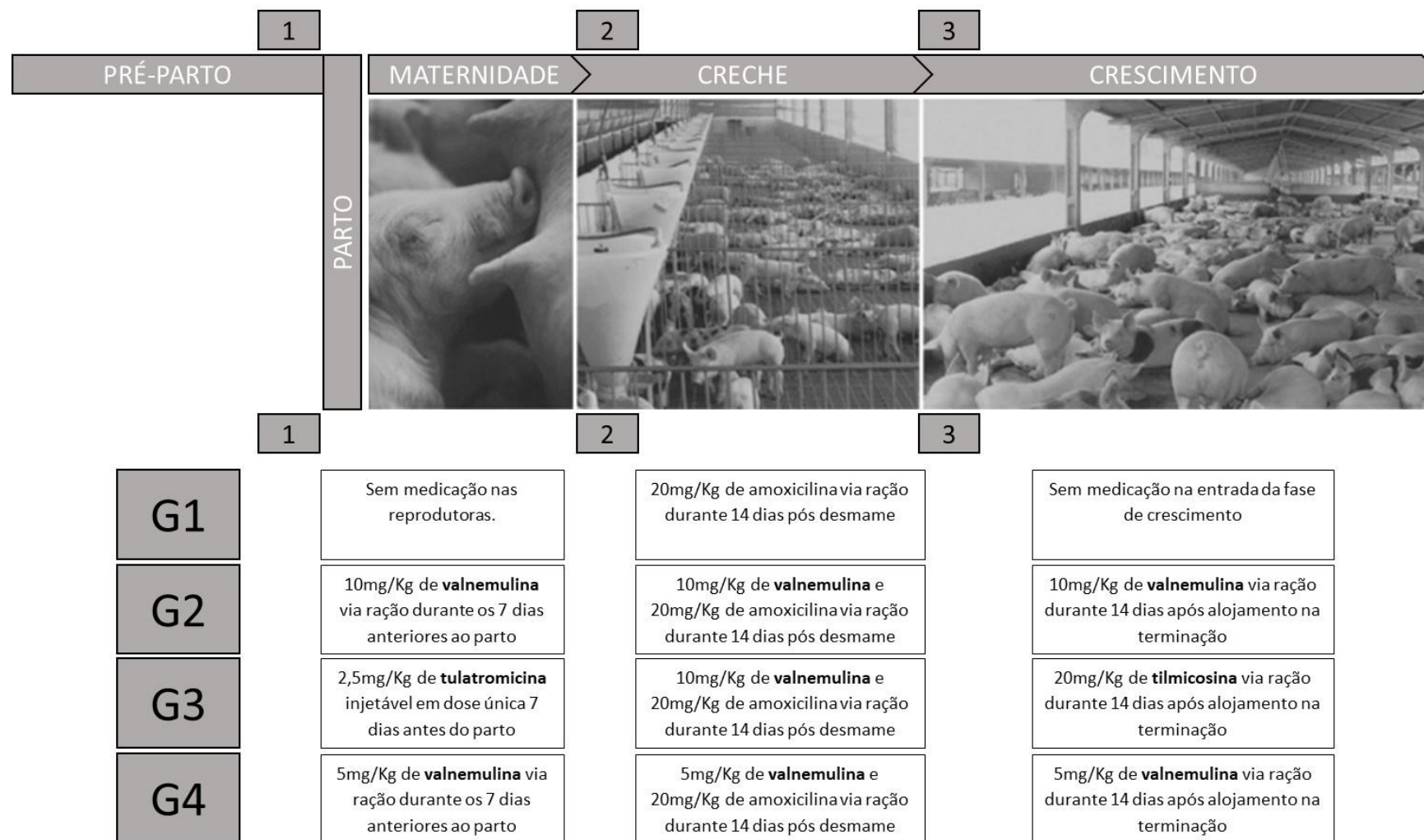
38. Fano, E.; Pijoan, C.; Dee, S.; Deen, J. Effect of Mycoplasma Hyopneumoniae Colonization at Weaning on Disease Severity in Growing Pigs. *Can. J. Vet. Res.* **2007**, 71 (3), 195–200.

39. PIETERS, M.; PIJOAN, C.; FANO, E.; DEE, S. An Assessment of the Duration of Mycoplasma Hyopneumoniae Infection in an Experimentally Infected Population of Pigs. *Vet. Microbiol.* **2009**, 134 (3–4), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.016>.

40. Petri, F.A.M.; Sonalio, K.; de Souza Almeida, H.M.; Ferraz, M.E.S.; Storino, G.Y.; de Souza, M.R.; André, M.R.; de Oliveira, L.G. Porcine Hemothropic Mycoplasmas Infection Associated with Productive Impact in Intensive Pig Production. *Porc. Heal. Manag.* **2020**, *6* (1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00171-1>.
41. Wilson, S.; Van Brussel, L.; Saunders, G.; Runnels, P.; Taylor, L.; Fredrickson, D.; Salt, J. Vaccination of Piglets up to 1 Week of Age with a Single-Dose Mycoplasma Hyopneumoniae Vaccine Induces Protective Immunity within 2 Weeks against Virulent Challenge in the Presence of Maternally Derived Antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, *20* (5), 720–724. <https://doi.org/10.1128/CVI.00078-13>.
42. Maes, D.; Boyen, F.; Devriendt, B.; Kuhnert, P.; Summerfield, A.; Haesebrouck, F. Perspectives for Improvement of Mycoplasma Hyopneumoniae Vaccines in Pigs. *Vet. Res.* **2021**, *52* (1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00941-x>.
43. Bandrick, M.; Theis, K.; Molitor, T.W. Maternal Immunity Enhances Mycoplasma Hyopneumoniae vaccination Induced Cell-Mediated Immune Responses in Piglets. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10* (1), 124. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-124>.
44. Zimmermann, P.; Ziesenitz, V.C.; Curtis, N.; Ritz, N. The Immunomodulatory Effects of Macrolides—A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00302>.
45. Nau, R.; Sörgel, F.; Eiffert, H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (4), 858–883. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-10>.
46. DeRosa, D.C.; Veenhuizen, M.F.; Bade, D.J.; Shryock, T.R. In Vitro Susceptibility of Porcine Respiratory Pathogens to Tilmicosin. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **2000**, *12* (6), 541–546. <https://doi.org/10.1177/104063870001200608>.
47. Giguère, S.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*; Ed. Wiley Blackwell: Atlanta, USA, 2013.
48. EMEA European Medicines Agency. *Veterinary Medicines and Inspections. Valnemulin – Summary Report, EMEA/MRL/339/98-FINAL*. May; 1998.
49. Spinosa, H.S.; Gorniak, S.L.; Bernardi, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*; Editora Guanabara Koogan, 2011.
50. Hirose, F.; Neto, J.S. Utilização de Medicação via Água de Bebida Na Suinocultura: Aspectos Práticos e Econômicos. Simpósio Brasil Sul de Suinocultura. In *Anais do V Simpósio Brasil Sul de Suinocultura e do IV Brasil Sul Pig Fair, 14 a 16 de agosto de 2012*; Embrapa Suínos e Aves: Concórdia, SC, 2012.

8. Material suplementar

Figura S1. Esquema de medicação utilizados nos animais dos grupos de 1 a 4.



²Capítulo III – Aspectos farmacológicos da valnemulina, tilmicosina e tulatromicina aplicados ao tratamento de doenças respiratórias em suínos

Giovani M. Stingelin¹; Marina L. Mechler-Dreibi¹; Gabriel Y. Storino¹; Karina Sonálio¹; Henrique M. S. Almeida¹; Fernando A. M. Petri¹; Luís Guilherme de Oliveira¹

¹São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences (FCAV). Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

Resumo

Enfermidades respiratórias estão entre as principais causas de prejuízos econômicos e ao bem-estar na produção de suínos. Diferentes bactérias podem atuar de forma conjunta causando o Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) cujo controle demanda ações estratégicas do ponto de vista sanitário. Nesse sentido, antimicrobianos podem apresentar bons resultados quando aplicado de forma racional e bem fundamentada. No presente estudo, a concentração no pulmão ao longo do tempo foi avaliada para valnemulina, tilmicosina e tulatromicina em suínos medicados. Também foram realizados estudos *in vitro* para avaliar a concentração inibitória e bactericida mínima para as moléculas considerando os principais patógenos respiratórios envolvidos no CDRS. A avaliação dos resultados de farmacocinética e de susceptibilidade, quando analisados conjuntamente demonstraram que do ponto de vista da inibição do crescimento bacteriano, os três antimicrobianos foram efetivos e que uma considerável atividade bactericida foi evidenciada para valnemulina e tulatromicina. Do ponto de vista de biodisponibilidade, a valnemulina demonstrou um curto período para atingir a concentração pulmonar máxima (3 horas), enquanto a tulatromicina apresentou disponibilidade pulmonar por um período prolongado de até 336 horas após a administração do medicamento. As informações obtidas no presente estudo são essenciais para que protocolos medicamentosos utilizando tais moléculas possam ser bem empregados e apresentem os melhores resultados na produção.

Palavras-chave: biodisponibilidade, farmacocinética, macrolídeos, pleuromutilinas

²Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista Antibiotics. ISSN 0021-8820

1. Introdução

Desafios respiratórios em suínos são um dos principais causadores de prejuízos econômicos e produtivos nos plantéis, além de causarem prejuízos ao bem estar dos animais [1]. Doenças respiratórias por sua vez envolvem principalmente vírus e bactérias que em geral atuam em conjunto promovendo um complexo de doenças respiratórias dos suínos e têm como agente principal o *M. hyopneumoniae*, que atua de forma primária, diretamente causando prejuízo a saúde pulmonar dos indivíduos [2] e predispondo-os a infecções secundárias por diversos agentes, sendo os principais: *Pasteurella multocida*, *Glaesserella parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus* sp. e *Bordetella bronchiseptica* [3].

Medidas de controle de enfermidades respiratórias em suínos demandam um conjunto de ações estratégicas e coordenadas para que resultados favoráveis sejam alcançados, visto que a dinâmica das infecções CDRS são complexas e difíceis de serem controladas [1]. A vacinação por si só, não é completamente eficaz no controle completo das infecções, tratamento com antimicrobianos e medidas de biosseguridade são medidas complementares a vacinação [4]. Nos dias atuais, tem sido amplamente discutido o uso racional de antimicrobianos, com o objetivo de que os efeitos negativos do uso indiscriminado de moléculas sejam minimizados não apenas na produção animal, mas na sociedade como um todo, considerando o conceito de saúde única. Portanto, mudanças nas práticas de tratamento profilático e metafilático na produção animal deverão ser implementadas e demandam conhecimento técnico-científico para que decisões possam ser bem fundamentadas, aliando as mudanças dos protocolos medicamentosos com a manutenção dos níveis produtivos.

Macrolídeos e Pleuromutilinas são classes de moléculas consideradas de alta eficácia contra patógenos respiratórios e possuem mecanismos de ação semelhantes atuando na porção 50S ribossomal [5],[6]. Valnemulina, tilmicosina e tulatromicina além do alto potencial antimicrobiano em suínos, possuem a vantagem de não pertencer ao Grupo III de antimicrobianos classificados pela OMS (Quinolonas, Cefalosporinas, Polimixinas e Ácidos Fosfônicos), que é uma categoria de fármacos que apesar de utilizados em animais, é tida como último recurso em virtude da

possibilidade de disseminação de genes de resistência que causam impactos à saúde humana.

Devido à complexidade das doenças respiratórias em suínos, estudos *in vivo* com animais infectados devem ser fundamentados em dados de farmacocinética e de eficácia no controle dos microorganismos para que protocolos de tratamento possam ser delineados de forma a otimizar a ação das moléculas, utilizando antimicrobianos de forma consciente e estratégica.

O presente estudo teve como objetivo avaliar de forma conjunta resultados de concentração pulmonar de valnemulina, tilmicosina e tulatromicina ao longo do tempo, e a eficácia *in vitro* determinando a concentração inibitória e bactericida mínima para os principais patógenos respiratórios em suínos.

2. Material e métodos

Os estudos clínicos *in vivo* e etapas analíticas para avaliação da biodisponibilidade da tilmicosina, valnemulina e tulatromicina baseados no guia EMEA/CVMP/133/99-Final “*Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species*” foram realizados visando a avaliação da eficácia clínica, tolerância no animal medicado e segurança alimentar.

Para obter informações a respeito da eficiência das moléculas contra bactérias patogênicas dos suínos, além dos resultados dos estudos *in vivo*, foram também realizados os testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), configurando a etapa *in vitro*, para que desta forma os resultados das concentrações dos fármacos no pulmão dos suínos pudessem ser analisados conjuntamente com as CIM e CBM em relação aos microorganismos de interesse na espécie. Para os três fármacos foi obtido os valores de concentração máxima plasmática (C_{max}) que determina ápice da concentração do princípio ativo no plasma pós administração. Bem como foi determinado a área sob a curva de concentração do fármaco no plasma ao longo do tempo (AUC) que por sua vez representa a exposição total do organismo à substância ativa em questão.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética (CEUA 009149/18) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp.

2.1 Estudo de Farmacocinética *in vivo*

2.1.1 Etapa clínica - tilmicosina

O estudo clínico e analítico para avaliação da biodisponibilidade da tilmicosina foi conduzido na unidade experimental (Esmeraldas - MG) e no Laboratório da empresa Nanocore Biotecnologia S/A. O delineamento experimental do estudo *in vivo* foi baseado no guia EMEA/CVMP/133/99-Final “*Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species*” visando a avaliação da eficácia clínica, tolerância no animal medicado e segurança alimentar.

Para o estudo foram utilizados 36 suínos adultos de linhagem comercial sendo 17 machos e 19 fêmeas. Ao todos foram formados nove grupos com quatro animais cada, para avaliação farmacocinética da molécula. Os indivíduos de todos os grupos foram medicados via oral com tilmicosina por gavagem na dose de 20 mg por quilo de peso vivo (mg/Kg/PV) durante três dias consecutivos.

Os indivíduos medicados dos diferentes grupos foram submetidos a eutanásia. Cada grupo de animais foi abatido em diferentes momentos, de forma a se obterem amostras de pulmão antes da administração da 3ª dose do produto no T0 (momento da administração via oral), T0,5 (meia hora), T1 (uma hora), T2 (duas horas), T2,5 (duas horas e meia), T3 (três horas), T4 (quatro horas), T6 (seis horas) e T12 (12 horas) indicando o intervalo de tempo em horas entre a administração da terceira dose do produto e a realização da eutanásia.

2.1.2. Etapa clínica - valnemulina

O estudo clínico e analítico para avaliação da biodisponibilidade da tilmicosina foi conduzido na unidade experimental (Esmeraldas - MG) e no Laboratório da empresa Nanocore Biotecnologia S/A.

Para o estudo foram utilizados 40 suínos jovens com peso corpóreo acima de 30 kg (20 machos e 20 fêmeas não prenhes). Os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 10 grupos com quatro animais cada (grupos A, B, C, D, E, F, G, H, I e J). Os animais selecionados foram mantidos em baias coletivas antes da realização do tratamento e foram pesados num intervalo máximo de 24 horas antes do momento previsto para a administração da substância-teste.

Todos os animais foram medicados com a dose de 10 mg de valnemulina por quilograma de peso corpóreo, por via oral através de gavagem, durante cinco dias consecutivos. A administração do medicamento foi feita com intervalo de 24 horas $\pm$ 1 hora. Durante o experimento, os animais tiveram livre acesso a alimentação e água isentos de qualquer medicamento e foram inspecionados diariamente.

Ao término do período de cinco dias de tratamento todos os indivíduos foram eutanasiados. Os grupos de animais foram eutanasiados para colheita de fragmentos pulmonares em diferentes momentos após a aplicação de valnemulina: Tzero (momento da administração via oral), T 0,5 (meia hora), T1 (uma hora), T2 (duas horas), T3 (três horas), T4 (quatro horas), T5 (cinco horas), T6 (seis horas), T8 (oito horas), T12 (12 horas).

2.3. Etapa clínica - tulatromicina

A etapa analítica foi realizada pelo laboratório Labfor localizado em Campinas-SP.

Foram selecionados 55 suínos machos e fêmeas de linhagem comercial de aproximadamente 30 kg, em bom estado nutricional e boas condições clínicas de saúde. Os animais foram divididos em 13 grupos contendo quatro animais cada.

Todos os animais receberam a tulatromicina pela via intramuscular, na dose 0,025 mL/Kg/PV em dose única. Para a coleta de amostras de pulmão, os grupos foram abatidos em tempos pré-estabelecidos, sendo estes, T6 (seis horas), T12 (12 horas), T18 (18 horas), T24 (24 horas), T48 (48 horas), T72 (72 horas/3 dias), T120 (120 horas/5 dias), T168 (168 horas/7 dias), T192 (192 horas/8 dias), T240 (240 horas/10 dias), T288 (288 horas/12 dias) e T336 (336 horas/14 dias) após o término da administração do medicamento.

2.1.4 Colheita de amostras dos estudos

Os estudos clínicos para avaliação das concentrações das moléculas no pulmão de suínos foram realizados atendendo aos dispositivos da Lei nº 11.794 (Lei Arouca) de 08/10/2008 que estabelece os procedimentos para uso de animais em experimentação científica, regulamentada pelo decreto nº 6.899 de 15/07/2009 que dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria- Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA.

Após o procedimento de eutanásia os animais dos diferentes estudos foram necropsiados e amostras de pulmão foram colhidas em *pool* de fragmentos obtidos de cada um dos lobos formando uma única amostra que foi armazenada em tubos plásticos estéreis de 15 mL em duplicata acondicionados a -20°C até a realização das análises para avaliar a concentração da molécula no tecido.

As análises para avaliação da presença de tilmicosina e valnemulina no pulmão de suínos de cada um dos respectivos estudos foram realizadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC/MS/MS) no laboratório da Nanocore Biotecnologia – Campinas, SP. A detecção foi realizada por espectrometria de massas no modo MRM (Monitoramento de Múltiplas Reações) para aquisição dos dados, utilizando ionização por *electrospray* positivo (ESI+). As análises de tulatromicina usaram a mesma técnica e foram realizadas pelo laboratório Labfor localizado em Campinas- SP.

As amostras foram processadas para clarificação e extração do analito de interesse e foram analisadas em bateladas denominadas “Corridas Analíticas”. As corridas analíticas foram estabelecidas respeitando-se o tempo máximo de estabilidade do analito após o processamento das amostras.

As amostras de pulmão de suínos foram processadas para que fossem submetidas ao sistema cromatográfico da seguinte forma: após o descongelamento das amostras de pulmão homogeneizadas, 8,0 mL de metanol e 2,0 mL de água purificada a porções de um grama de amostras de pulmão de suínos em *pool*. Em seguida os tubos contendo a amostra, metanol e água foram submetidas ao vórtex 20 segundos a temperatura ambiente e centrifugadas a 10.000 rpm, 4°C por 5 minutos e os sobrenadantes foram aliquotados em frações de 600 µL em tubos plásticos esterilizados de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético 10% (p/V) em cada amostra que foram então homogeneizadas em vórtex por 20 segundos e novamente centrifugadas a 4°C, 10.000 rpm por 5 minutos, transferidas para criotubos de 2 mL com o auxílio de seringas com filtro de membrana de 0,22 µm acoplado.

2.2. Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de patógenos respiratórios

Para avaliar a eficácia dos antimicrobianos, foram realizados estudos para a determinação da CIM e da CBM para os princípios ativos tilmicosina, valnemulina e tulatromicina, as espécies bacterianas escolhidas para o estudo foram selecionadas devido à sua importância em suinocultura, foram escolhidas cepas brasileiras provenientes de isolados clínicos e cepas ATCC.

Os estudos de CIM E CBM foram realizados no Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal – CEDISA e no Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

Diluições seriadas de cada um dos antimicrobianos foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para tilmicosina as concentrações avaliadas foram de 0.06 a 16 µg/mL, para valnemulina de 0.03 a 8 µg/mL e para tulatromicina de 0.25 a 16 µg/mL.

As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas para tilmicosina foram determinadas frente às bactérias: *Pasteurella multocida* (cinco cepas), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (cinco cepas), *Glaesserella parasuis* (cinco cepas) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (uma cepa). Para valnemulina as CIM e CBM foram determinadas para *Pasteurella multocida* (três cepas), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (três cepas), *Glaesserella parasuis* (três cepas) e *Streptococcus suis* (três cepas). A CIM e CBM para tulatromicina foi determinada para *Pasteurella multocida* (duas cepas), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (duas cepas), *Glaesserella parasuis* (duas cepas) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (uma cepa) e *Bordetella bronchiseptica* (duas cepas). Para todos os testes foram utilizados isolados clínicos de casos clínicos de suínos. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada nos testes para as três moléculas como referência visto que os valores esperados para CIM são descritos no CLSI.

Para realização dos testes de CIM e CBM para as cepas bacterianas foram semeadas em caldo BHI (*brain heart infusion*) ou BHI suplementado com soro fetal bovino e NAD e incubadas a 37°C por 18 horas. Após esse período as culturas foram

diluídas em solução salina até a concentração de 1×10^7 UFC/mL. O CIM foi obtido através da comparação da turbidez com uma solução padrão de Mc Farland de 0.5. Após o ajuste com a escala de turbidez a concentração foi confirmada através de plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia.

Para *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* foram realizados pelo método de CIM em meio líquido utilizando o meio de cultivo Friis. Foram avaliadas as diferentes concentrações dos antimicrobianos diluídos em 100 µL de meio Friis em uma placa de 96 poços. Em cada um dos poços foi adicionado 100 µL de cultivo do *Mycoplasma* sp. em concentração final de 10^5 color-changing units/mL. As placas inoculadas foram mantidas a 37°C em shaker movimentando a 150 rpm. O CIM foi determinado como sendo a menor concentração em que não tenha sido observado o crescimento bacteriano que por sua vez é evidenciado pela ausência de mudança de cor do meio Friis.

3. Resultados

3.1 Avaliação da concentração de tilmicosina no tecido alvo e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após administração da terceira dose, as concentrações de tilmicosina nos pulmões foram avaliadas após 30 minutos, uma hora, duas horas, duas horas e meia, três horas, quatro horas, seis horas e 12 horas. A partir desses dados foi estabelecida a curva de concentração tecidual ao longo do período de 12 horas. Os resultados indicaram que a concentração da molécula no tecido pulmonar aumentou de 0 em T0 a 4.42 (µg/g) em T3, momento em que houve o pico de concentração. De T3 a T12 a concentração diminuiu tendo sido observado as seguintes concentrações µg/g de tecido pulmonar: 3.96 em T4, 3.01 em T6 e após 12 horas a concentração de tilmicosina registrada foi de 1.43.

Os resultados individuais obtidos no estudo de determinação da CIM e CBM de tilmicosina demonstraram que de modo geral, as Concentrações Inibitórias Mínimas variaram de $\leq 0,06$ a 4,0 µg/mL para as cepas bacterianas testadas (tabela 1).

Tabela 1: Valores da CIM e CBM da tilmicosina frente às cepas bacterianas testadas.

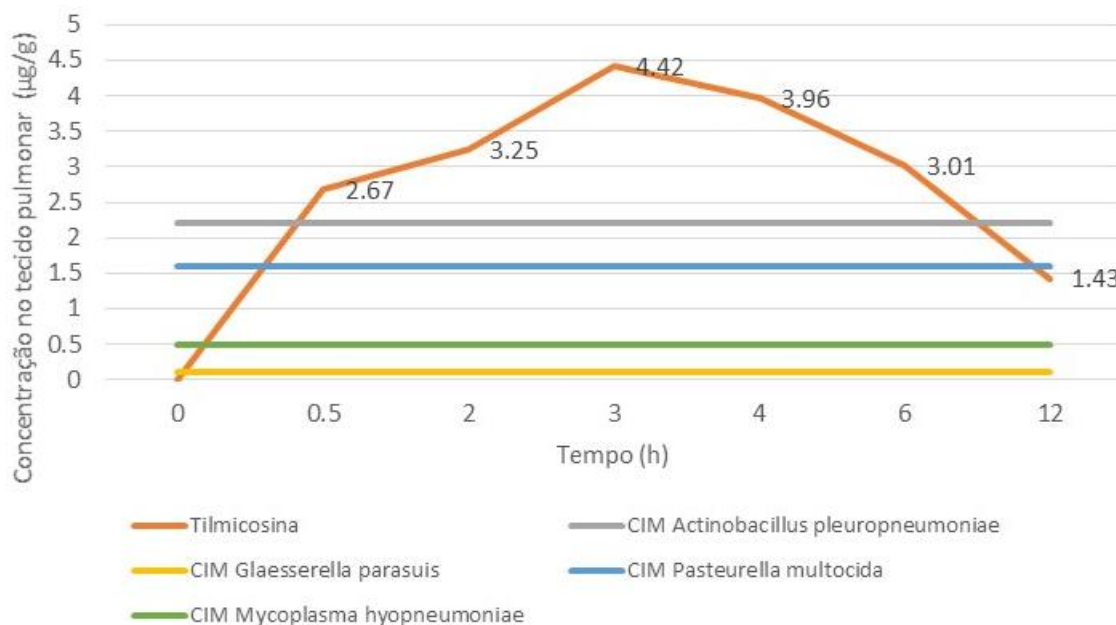
Micro-organismos	Cepa	CIM* (µg/mL)	CBM** (µg/mL)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (1)	AP 2512	2	8
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (2)	AP 1013	2	8
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (3)	AP 2212	2	8
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (4)	AP 1812	4	8
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (5)	AP 2613	1	4
<i>Pasteurella multocida</i> (1)	PM 1012	1	4
<i>Pasteurella multocida</i> (2)	PM 5112	2	4
<i>Pasteurella multocida</i> (3)	PM 1513	1	4
<i>Pasteurella multocida</i> (4)	PM 1111	2	8
<i>Pasteurella multocida</i> (5)	PM 6612	2	4
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	ATCC 25934	0,5	-
<i>Glaesserella parasuis</i> (1)	HP 1010	0,12	2
<i>Glaesserella parasuis</i> (2)	HP 1210	0,12	1
<i>Glaesserella parasuis</i> (3)	HP 0511	≤0,06	1
<i>Glaesserella parasuis</i> (4)	HP 1311	≤0,06	1
<i>Glaesserella parasuis</i> (5)	HP 2511	0,12	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 2913	1	4

*CIM: concentração inibitória mínima; **CBM: concentração bactericida mínima.

Comparando a concentração pulmonar obtida com a CIM de cada micro-organismo (considerando-se 1mL equivalente a 1g), verificou-se que a concentração máxima superou a CIM de todas as cepas bacterianas avaliadas. Verificando os resultados obtidos, que traçaram a curva de concentração tecidual no período de 12 horas (figura 8), podemos observar que a tilmicosina é rapidamente absorvida e

distribuída após administração oral a suínos, atingindo uma concentração pulmonar máxima média acima de 4 µg/g (C max) após 3 horas (T max) [7].

Figura 1. Concentração tecidual pulmonar de tilmicosina (µg/g) ao longo de 12 horas após a terceira administração de **HI-BAC**® via gavagem a suínos comparada com a CIM média de cada patógeno estudado.



3.2 Avaliação da concentração de valnemulina no tecido alvo

Após administração a quinta administração de valnemulina, as concentrações da molécula nos pulmões foram avaliadas em diferentes momentos ao longo do período de 12 horas. A partir dos resultados obtidos foi estabelecida a curva de concentração tecidual. Os resultados indicaram que a molécula pode ser detectada no tecido pulmonar a partir de 30 minutos em uma concentração de 1.83 µg/g permanecendo na mesma faixa até a primeira hora (1.62 µg/g). A partir de T2 notou-se um aumento considerável da concentração, 21.19 µg/g que permaneceu crescente até atingir o pico em T4 (52.59 µg/g). A partir de T5 (36.47 µg/g) notou-se o início de uma diminuição progressiva na concentração do fármaco que após 12 horas apresentou uma concentração 4.24 µg/g no tecido alvo.

Os resultados individuais obtidos no estudo de determinação da CIM e CBM de valnemulina demonstraram que de modo geral, as Concentrações Inibitórias Mínimas variaram de $\leq 0,004$ a 2,0 µg/mL para as cepas bacterianas testadas (tabela 2).

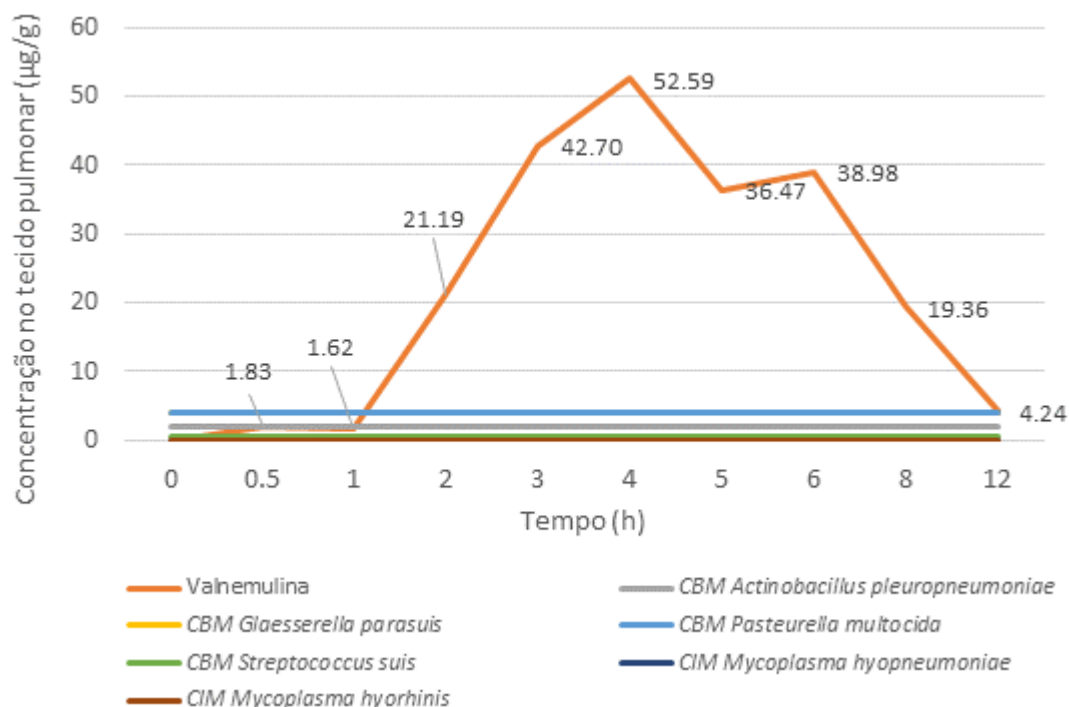
Comparando a concentração pulmonar obtida com o CIM e CBM de cada microrganismo (figura 2), verificamos que a concentração média é superior à CIM e CBM de todas as bactérias avaliadas por um período maior que 12 horas.

Tabela 2: Valores da CIM e CBM para as cepas bacterianas testadas.

Microrganismos	Cepa	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>A. pleuropneumoniae</i> (1)	AP 0612	0,5	2
<i>A. pleuropneumoniae</i> (2)	AP 1222	0,5	2
<i>A. pleuropneumoniae</i> (3)	AP 1332	1	2
<i>Glaesserella parasuis</i> (1)	HP 1010	1	2
<i>Glaesserella parasuis</i> (2)	HP 1210	1	4
<i>Glaesserella parasuis</i> (3)	HP 0511	2	4
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> *	ATCC 25934	< 0,004	-
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> *	ATCC 17981	< 0,004	-
<i>Pasteurella multocida</i> (1)	PM 5511	2	4
<i>Pasteurella multocida</i> (2)	PM 6811	0,5	2
<i>Pasteurella multocida</i> (3)	PM 8812	0,5	2
<i>Streptococcus suis</i> (1)	SS 3012	0,12	0,25
<i>Streptococcus suis</i> (2)	SS 3212	0,12	0,5
<i>Streptococcus suis</i> (3)	SS 2312	0,25	0,5

*Cepas testadas no laboratório CEDISA. As demais cepas foram testadas no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia da USP.

Figura 2. Correlação da concentração pulmonar de valnemulina X CBM dos principais patógenos respiratórios.



3.3 Avaliação da concentração de tulatromicina no tecido alvo

Após administração intramuscular da tulatromicina, dose única, a concentração do princípio ativo nos pulmões foi avaliada ao longo de 336 horas. A partir da curva de concentração tecidual, observa-se que níveis de tulatromicina foram detectados a partir de T1 na concentração de 1.91 µg/g e uma elevação progressiva da concentração pulmonar foi notada até T4, momento em que foi registrado a concentração pulmonar máxima (C_{max}) de 3,456 µg/g. A partir de T4 observou-se uma diminuição constante da concentração até atingir 0.6 µg/g em T336 (figura 3). A partir da curva formada pelas concentrações ao longo do tempo foi obtido o valor de 506,91 µg/g/h que representa a área sob a curva (ASC).

Os resultados individuais obtidos no estudo de determinação da CIM e CBM de tulatromicina estão listados na Tabela 3, a seguir. De modo geral, as Concentrações Inibitórias Mínimas variaram de $\leq 0,004$ a 0,25 µg/mL para as cepas bacterianas testadas.

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 apresentou resultado da CIM de 4 µg/mL, valor dentro do preconizado pelo documento VET01S (CLSI, 2020) para a tulatromicina que é de 2 a 8 µg/mL. A mesma cepa apresentou concentração bactericida mínima de 16 µg/mL.

Dentre as bactérias isoladas de suínos testadas, as cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Glaesserella parasuis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* apresentaram-se sensíveis à tulatromicina, com valores de CIM entre <0,004 e 0,25 µg/mL. Com base nos resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade à tulatromicina.

Comparando a concentração pulmonar obtida com o CIM e CBM de cada microrganismo (figura 3), verificamos que a concentração média é superior à CIM e CBM de todas as bactérias avaliadas por um período maior que 336 horas

Tabela 3: Valores de CIM e CBM para as cepas bacterianas testadas.

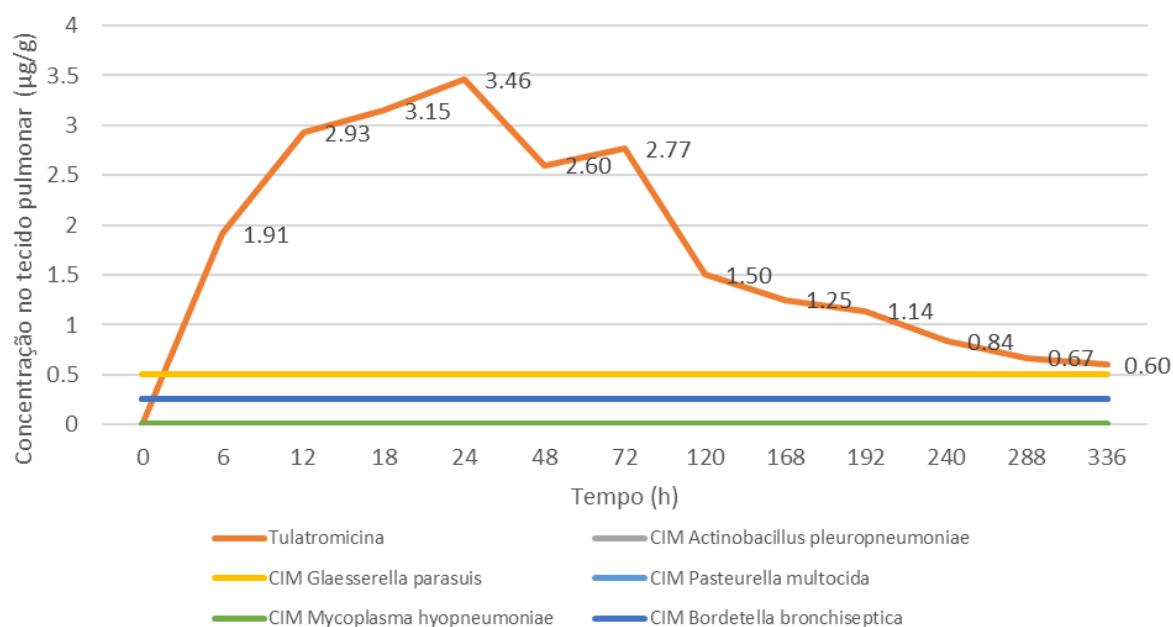
Bactérias	Cepa*	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1	0,25	0,25
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2	0,25	0,25
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	0,25	2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	0,25	2
<i>Glaesserella parasuis</i>	1	0,0625	0,25
<i>Glaesserella parasuis</i>	2	0,5	2
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1	< 0,004	< 0,004
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,25	2
<i>Pasteurella multocida</i>	2	0,25	0,25

* Isolados de casos clínicos a campo não identificados

*CIM: concentração inibitória mínima

**CBM: concentração bactericida mínima

Figura 3 – Curva de Concentração Média de tulatromicina no pulmão de suínos medicados em função do tempo após dose única via intramuscular comparada com a maior CIM de cada patógeno estudado.



4. Discussão

O uso racional de antimicrobianos deve ser fundamentado em dados que demonstrem o real papel das moléculas no controle e erradicação dos patógenos em associação com outras medidas sanitárias. Para que antimicrobianos sejam corretamente empregados é necessário, além de avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* aos diversos microrganismos, considerar aspectos farmacológicos como a concentração no tecido alvo.

Uma forma de provar a eficácia de um determinado agente antimicrobiano contra um microorganismo é conduzindo estudos de perfil farmacocinético *in vivo*, e avaliar os resultados em conjunto com os resultados de testes *in vitro* para determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Mínima Concentração bactericida em relação ao micro-organismos de interesse [8].

No presente estudo a administração oral de tilmicosina na dose de 20 mg/kg de peso em suínos resultou em concentrações no tecido pulmonar (4,42µg/g) acima da concentração inibitória mínima para os principais agentes bacterianos envolvidos com doença respiratória em suínos o que corrobora com dados observados em um estudo prévio (Stingelin et al., 2020)

De acordo com Jacobs [9], para fármacos tempo-dependente é necessário que a concentração no tecido alvo permaneça acima do valor do CIM por no mínimo 40% do tempo compreendido entre doses. Bem com demonstrado em estudos anteriores [7], foi observado que a concentração de tilmicosina no pulmão permaneceu acima do CIM por tempo considerado suficiente demonstrando ser efetiva no controle de patógenos como o *Mycoplasma hyopneumoniae*, a *Pastereulla multocida*, o *Actinobacillus pleuropneumoniae* e a *Glaesserella parasuis in vitro*.

Estudos de farmacocinética/farmacodinâmica relacionados ao controle e tratamento do *Mycoplasma hyopneumoniae* são escassos [10], embora o *M. hyopneumoniae* seja o principal agente envolvido com a pneumonia enzoótica suína atuando diretamente na ocorrência de lesões pulmonares e perdas produtivas, bem como predipondo a infecção por patógenos secundários [1]. Pesquisadores tem desenvolvido o modelo dinâmico *in vitro* de pesquisa farmacocinética aplicado ao controle do *M. hyopneumoniae* usando cepas de reduzida sensibilidade antimicrobiana (M3 e M4) avaliando o tempo necessário para redução na concentração bacteriana. A área sob a curva de tempo-concentração nas 96h dividida pelo CIM (ASC_{0-96h}/CIM) foi o parâmetro ajustado para predizer a atividade antibacteriana da tilmicosina contra o *M. hyopneumoniae* ($R^2=0.99$). Os resultados do estudo indicaram que os efeitos na redução da contagem bacteriana iniciaram apenas após 36h. Os valores estimados de concentração plasmática máxima (C_{max}) para reduzir $2\log_{10}$ e $3\log_{10}$ foi de 1,44 e 1,91 e ocorrem 70,55h e 96,72h após o início do tratamento com tilmicosina, o que reitera a hipótese da tilmicosina ser um fármaco tempo-dependente e com importante poder anti-micoplásmico.

Em relação a valnemulina, o valor de CIM observado para a cepa de campo brasileira de *Mycoplasma hyopneumoniae* isolada pelo laboratório CEDISA foi <0,004, o mesmo CIM foi encontrado para uma cepa isolada de campo de *Mycoplasma hyorhinis*. De acordo com Fraile [11] o CIM da valnemulina é significativamente menor

para o *M. hyopneumoniae* comparado a outros antimicrobianos de outras classes, visto que no trabalho conduzido por Fraile o CIM90 de valnemulina variou de 0,0049 até 0,006 para diferentes cepas, enquanto CIM90 da tilvalosina (um macrolídeo de 16 carbonos assim com a tilmicosina) variou de 0,0125 até 0,05. Para a tulatromicina, um macrolídeo com uma cadeia de 13 carbonos (10%) e outra cadeia de 15 carbonos (90%), o CIM90 variou de 0,06 a 0,125. Para a tilmicosina o CIM90 variou de 0,39 até >16. Para a lincomicina o CIM90 variou de 0,0125 a > 8 e para a clortetaciclina o CIM90 foi de 0,78 a ≥ 100 [11].

De acordo com Giguère [12], as pleuromutilinas têm ação superior aos macrolídeos contra *Mycoplasma* sp. e dentro desse grupo de quimioterápicos antimicrobianos, a valnemulina é aproximadamente 30 vezes mais efetiva que a tiamulina contra *Mycoplasma* sp. *in vitro* [13].

A $C_{\max}$ da valnemulina encontrada foi de 52,59 µg/g de tecido pulmonar, quatro horas após a administração oral, permanecendo em 4,24 µg/g de tecido pulmonar 12 horas após a administração.

Os resultados encontrados demonstram que, após cinco administrações consecutivas da valnemulina por via oral a suínos, na dose equivalente a 10 mg por kg de peso corpóreo, com intervalo de cerca de 24 horas entre as administrações, a concentração pulmonar do fármaco atingiu 52,59 µg/g no tempo de quatro horas. Estes dados têm uma forte correlação com os dados descritos por Zhang et al [14] que observou que suínos medicados com uma única via oral de valnemulina 10 mg/kg de peso corpóreo levou a uma concentração máxima pulmonar de 49,86 µg/g no tempo ($T_{\max}$) de quatro horas.

Na administração oral em suínos o pico de concentração plasmática de valnemulina é alcançado em uma a quatro horas após sua administração e sua biodisponibilidade excede 90% quando administrada via ração [15],[16]. A valnemulina é um fármaco tempo-dependente e apresenta importante atividade contra bactérias anaeróbias (*Fusobacterium necrophorum*, *Brachyspira hyodysenteriae*) e o *Mycoplasma*, é ativa contra algumas bactérias gram-positivo aeróbicas, como *Staphylococcus* spp., *Arcanobacterium pyogenes* e alguns estreptococos [17].

Há escassez de dados sobre a farmacocinética/farmacodinâmica da valnemulina *in vivo* em suínos. Com os resultados de $c_{\max}$ observados no presente estudo, bem

como os resultados do CIM para *Mycoplasma sp.* e os demais patógenos de importância respiratória, é esperado que a valnemulina seja efetiva no tratamento de indivíduos infectados e no controle do *M. hyopneumoniae* quando implementado em protocolos medicamentosos. Estudos futuros poderão fornecer mais informações a respeito da valnemulina para compreender se trata-se de uma molécula tempo ou dose-dependente, mas espera-se que sua eficácia antimicrobiana para patologias respiratórias em suínos seja superior as demais moléculas comumente utilizadas.

Outro fármaco com atividade antimicrobiana diferenciada para o controle das enfermidades respiratórias é a tulatromicina. No estudo de concentração pulmonar, apesar do fármaco ter sido administrado via parenteral intramuscular e na dose de 2,5mg/Kg de peso vivo, a concentração pulmonar máxima (C_{max}) foi de 3,456 µg/g e só foi atingida em 24 horas após a administração do produto (T_{max}). Apesar do tempo superior quando comparado a valnemulina e tilmicosina para atingir o tecido pulmonar, as concentrações permaneceram acima do CIM para o *Mycoplasma hyopneumoniae* testada (CIM < 0,004) e dos demais patógenos de importância respiratória (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Glaesserella parasuis* e *Pasteurella multocida*) por mais de 336h (14 dias).

É relatado que a tulatromicina, apresenta prolongada atividade bacteriostática com efeito pós-antibiótico [18]. Considerando que a ASC_{total} é equivalente à quantidade total de fármaco absorvido desde o momento da dosagem até a última concentração mensurável, é possível afirmar que do momento da aplicação até 336 horas (14 dias) após, o fármaco mantém concentrações terapêuticas, comprovando o prolongado efeito pós-antibiótico e sua longa ação sobre os micro-organismos testados.

De acordo com Mattoes e Nightingale [8], a ação dos macrolídeos aumenta quando a ASC atinge valores duas a quatro vezes superior ao valor de CIM. Ainda de acordo com os autores, a ação desses fármacos é potencializada pelo acúmulo intracelular da droga, que é extenso para macrolídeos e permite que as concentrações intracelulares se mantenham elevadas por longos períodos, promovendo a eficácia contra patógenos respiratórios intracelulares comuns. Ainda, mesmo para aqueles macrolídeos que atingem concentrações baixas, há uma extensa liberação da droga presente no meio intracelular para o fluido extracelular, somado ao prolongado EPA,

o que ajuda a garantir que micro-organismos extracelulares sejam também eliminados efetivamente.

Em outro estudo comparativo entre antimicrobianos, uma única dose de tulatromicina foi tão efetiva quanto três administrações injetáveis diárias de enrofloxacin para o tratamento de suínos inoculados experimentalmente com *M. hyopneumoniae* [19].

As três moléculas avaliadas demonstraram alta absorção e afinidade pelo tecido pulmonar, o estudo de farmacocinética relacionado com o CIM desses antimicrobianos contra o *Mycoplasma hyopneumoniae* demonstra o alto potencial *in vitro* dessas moléculas controlarem o crescimento desse patógeno.

Devamos ressaltar que os resultados de CIM e CBM e resultados de concentração pulmonar são indicativos da possível eficácia dos fármacos *in vivo*, contudo mais estudos são necessários para avaliar o efeito real das moléculas no tratamento visto que a farmacocinética e farmacodinâmica em indivíduos sadios pode ser diferente quando comparada a indivíduos infectados [20]. Além disso, *in vivo*, patógenos podem atuar em conjunto e apresentam mecanismos complexos para manutenção no organismo e promovem alterações locais que podem interferir na ação de agentes antimicrobianos.

Em vista da necessidade de implementar o uso racional de antimicrobianos na produção animal, o presente estudo apresenta informações que podem fundamentar estudos *in vivo* para que experimentos possam ser delineados baseados nos aspectos farmacológicos das moléculas, otimizando assim os resultados obtidos.

5. Conclusão

O presente estudo apresenta informações importantes a respeito do perfil de susceptibilidade dos principais patógenos envolvidos com doenças respiratórias em suínos bem como apresenta as concentrações dos fármacos no tecido pulmonar de suínos ao longo do tempo. Em conjunto, as informações *in vitro* e *in vivo* fornecem dados importantes sobre a farmacodinâmica e farmacocinética de moléculas do ponto de vista da eficácia contra patógenos respiratórios em suínos e demonstrou que resultados positivos para valnemulina, tilmicosina e tulatromicina como efetivos na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, embora valnemulina e tulatromicina

tenham apresentado melhores resultados e também uma considerável ação bactericida. A valnemulina demonstrou atingir o pico de concentração pulmonar mais rápido que a tulatromicina que por sua vez apresentou concentrações pulmonares por um período mais longo que os fármacos avaliados, mas que diferente das demais é administrado via intramuscular dificultando o uso como tratamento metafilático na produção animal. Portanto, embora os mecanismos de ação de pleuromutilinas e macrolídeos sejam similares, apresentam particularidades em relação as características farmacocinéticas que devem ser consideradas ao estabelecer protocolos medicamentosos para o tratamento de suínos com enfermidades respiratórias.

6. Agradecimentos

À Farmabase Saude Animal Ltda pelo suporte financeiro e agradecemos aos membros do Laboratório de Medicina de Suínos – Unesp/FCAV pelo apoio com as colheitas e auxílio com avaliações laboratoriais, ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil.

7. Contribuição dos autores

Todos os autores do presente manuscrito contribuíram igualmente em todas as etapas com a idealização do estudo, execução, análise e redação.

8. Conflito de interesses

G.M.S é colaborador da empresa Farmabase Saúde Animal, Brasil.

9.Referencias

- 1.Maes, D.; Segales, J.; Meyns, T.; Sibila, M.; Pieters, M.; Haesebrouck, F. Control of *Mycoplasma Hyopneumoniae* Infections in Pigs. *Vet. Microbiol.* **2008**, *126* (4), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.008>.
- 2.Almeida, H.M.S.; Mechler-Dreibi, M.L.; Sonálio, K.; Ferraz, M.E.S.; Storino, G.Y.; Barbosa, F.O.; Maes, D.; Montassier, H.J.; de Oliveira, L.G. Cytokine Expression and *Mycoplasma Hyopneumoniae* Burden in the Development of Lung Lesions in Experimentally Inoculated Pigs. *Vet. Microbiol.* **2020**, *244*, 108647. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108647>.

3. Opriessnig, T.; Giménez-Lirola, L.G.; Halbur, P.G. Polymicrobial Respiratory Disease in Pigs. *Anim. Heal. Res. Rev.* **2011**, *12* (2), 133–148.
<https://doi.org/10.1017/S1466252311000120>.
4. Maes, D.; Sibila, M.; Kuhnert, P.; Segalés, J.; Haesebrouck, F.; Pieters, M. Update on Mycoplasma Hyopneumoniae Infections in Pigs: Knowledge Gaps for Improved Disease Control. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 110–124.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12677>.
5. Paukner, S.; Riedl, R. Pleuromutilins: Potent Drugs for Resistant Bugs—Mode of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2017**, *7* (1), a027110.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027110>.
6. Leclercq, R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. In *Clinical Infectious Diseases*; 2002; pp 482–492.
7. Stingelin, G.M.; Piráguine, M.R.; Carneiro, D.O.; Mechler-Dreibi, M L Oliveira, L.G. Correlation of Tilmicosin Pulmonary Bioavailability and Minimum Inhibitory Concentration of Respiratory Pathogens. In *Proceedings of International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*; 2020; p 217.
8. Mattoes, H.M.; Nightingale, C.H. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Macrolides. In *Macrolide Antibiotics*; Birkhäuser Basel: Basel, 2002; pp 25–36.
https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8105-0_3.
9. Jacobs, M.R. Optimisation of Antimicrobial Therapy Using Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters. *Clin. Microbiol. Infect.* **2001**, *7* (11), 589–596.
<https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00295.x>.
10. Huang, Z.; Hu, Z.; Zheng, H.; Xia, X.; Gu, X.; Shen, X.; Yang, H.; Ding, H. The PK/PD Integration and Resistance of Tilmicosin against Mycoplasma Hyopneumoniae. *Pathogens* **2020**, *9* (6), 487.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060487>.
11. Fraile, L. Treatment of Respiratory Diseases. In *Antimicrobial therapy in swine*; Servet editorial, Grupo Asís Biomedica: Zaragoza, Spain, 2013; pp 25–51.
12. Giguère, S.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*; Ed. Wiley Blackwell: Atlanta, USA, 2013.
13. Aitken, I.A.; Morgan, J.H.; Dalziel, R.; Burch, D.G.S.; Ripley, P.H. Comparative in Vitro Activity of Valnemulin against Porcine Bacterial Pathogens. *Vet. Rec.* **1999**, *144* (5), 128–128. <https://doi.org/10.1136/vr.144.5.128>.
14. Zhang, Z.; Zhang, C.Y.; Guo, J.P.; Zhu, L.X.; Luo, X.Y.; Wang, R.; Liu, Y.H. Pharmacokinetics and Lung Tissue Concentration of Valnemulin in Swine. *J. Anim. Vet. Adv.* **2011**, *10* (14), 1824–1828. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1824.1828>.
15. EMEA European Medicines Agency. *Veterinary Medicines and Inspections. Valnemulin – Summary Report, EMEA/MRL/339/98-FINAL*. May; 1998.

16. Spinosa, H.S.; Gorniak, S.L.; Bernardi, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*; Editora Guanabara Koogan, 2011.
17. Hirose, F.; Neto, J.S. Utilização de Medicação via Água de Bebida Na Suinocultura: Aspectos Práticos e Econômicos. Simpósio Brasil Sul de Suinocultura. In *Anais do V Simpósio Brasil Sul de Suinocultura e do IV Brasil Sul Pig Fair, 14 a 16 de agosto de 2012*; Embrapa Suínos e Aves: Concórdia, SC, 2012.
18. Levison, M.E. Pharmacodynamics of Antimicrobial Drugs. In *Infectious Disease Clinics of North America*; 2004; pp 451–465.
19. Nanjiani, I.A.; McKelvie, J.; Benchaoui, H.A.; Godinho, K.S.; Sherington, J.; Sunderland, S.J.; Weatherley, A.J.; Rowan, T.G. Evaluation of the Therapeutic Activity of Tulathromycin against Swine Respiratory Disease on Farms in Europe. *Vet. Ther.* **2005**, 6 (2), 203–213.
20. Xiong, J.; Zhu, Q.; Zhao, Y.; Yang, S.; Cao, J.; Qiu, Y. Tilmicosin Enteric Granules and Premix to Pigs: Antimicrobial Susceptibility Testing and Comparative Pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2019**, 42 (3), 336–345. <https://doi.org/10.1111/jvp.12753>.