

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Categorização anatomopatológica e detecção
etiológica em lesões pulmonares de suínos no abate**

Laíza Pinto Arruda
Médica Veterinária

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Categorização anatomopatológica e detecção
etiológica em lesões pulmonares de suínos no abate**

Discente: Laíza Pinto Arruda

Orientador: Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira

Coorientador: Dr. Henrique Meiroz de Souza Almeida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias

FICHA CATALOGRÁFICA

A779c	Arruda, Laiza Pinto Categorização anatomopatológica e detecção etiológica em lesões pulmonares de suínos no abate / Laiza Pinto Arruda. -- Jaboticabal, 2023 55 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Luis Guilherme de Oliviera Coorientador: Henrique Meiroz de Souza Almeida 1. Suínos. 2. Carcaça. 3. Pleurite. 4. PCR. 5. Doenças respiratórias. 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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CATEGORIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E DETECÇÃO ETIOLÓGICA EM LESÕES PULMONARES DE SUÍNOS NO ABATE

AUTORA: LAÍZA PINTO ARRUDA

ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

COORIENTADOR: HENRIQUE MEIROZ DE SOUZA ALMEIDA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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

Documento assinado digitalmente
gouvbr
LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
Data: 20/06/2023 09:50:40 (GMT-03:00)
Certificado em: https://cert.br.gov.br

Profa. Dra. RAQUEL APARECIDA SALES DA CRUZ (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Veterinárias / INBIO UFMS Campo Grande/MS

gouvbr

Prof. Dr. MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gouvbr
MATEUS DE SOUZA RIBEIRO MIONI
Data: 22/06/2023 11:05:29 (GMT-03:00)
Certificado em: https://cert.br.gov.br

Jaboticabal, 19 de junho de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Laíza Pinto Arruda – Nascida em 15 de novembro de 1996, na cidade de Ponte Nova – Minas Gerais, Brasil, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário de Viçosa – UNIVIÇOSA em 2016. Foi membro do NESUN – Núcleo de Estudos em Suinocultura, participando da organização de eventos e programas de extensão rural, e realizou estágios extracurriculares em granjas de suínos. O Trabalho de Conclusão de Curso foi realizado na área de Sanidade de Suínos, com o tema “Correlação entre manejo adotado e lesões histológicas em pulmões de suínos abatidos em frigorífico de Ponte Nova – MG”, sob orientação do Prof. Dr. Adriano França da Cunha, e o estágio curricular obrigatório também foi realizado na área Sanidade de Suínos, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão da Profa. Dra. Fernanda Almeida. Possui especialização em Gestão e Produção de Suínos – UNIVIÇOSA (2019). Experiência a campo com produção de suínos, em Barão de Cocais – MG (2019). Ingressou em agosto de 2020 no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, na FCAV – UNESP Jaboticabal, como bolsista CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar comigo mostrando minha fé, sendo minha direção nos momentos de adversidades e dando forças para concluir essa fase.

Mãe e Pai, mais uma vitória que eu dedico a vocês. Obrigada por apoiarem mais um sonho e fazerem de tudo para que eu não desistisse e acreditar que seria possível. Sou abençoada de ter uma família que batalha por mim e comigo.

Ao Prof. Dr. Luís Guilherme, agradeço pela oportunidade, pela confiança, e pelos ensinamentos. Agradeço aos colegas do Laboratório de Medicina de Suínos que se dispuseram a ajudar no desenvolvimento do projeto, foi um trabalho realizado a inúmeras mãos, e todas foram essenciais. Especialmente à Daniela, que foi uma grande amiga nessa jornada e quer por muitas vezes foi meu grande apoio em Jaboticabal.

Ao frigorífico Frigmel, em especial à pessoa do Ligerinho, por abrirem as portas para que realizássemos as coletas, e por toda ajuda.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, pela estrutura necessária e fundamental para a realização do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
3. Referências	7
CAPÍTULO 2	14
1. Introdução	15
2. Material e Métodos	17
2.1. <i>Delineamento experimental e coleta das amostras</i>	17
2.2. <i>Coleta de amostras</i>	18
2.3. <i>Avaliação macroscópica das carcaças e dos pulmões</i>	18
2.3.1. <i>Categorização das lesões de pleurisia</i>	18
2.3.2. <i>Índice para Pneumonia (IPP), porcentagens médias de pleurisias e consolidação pulmonar dos lotes</i>	19
2.4. <i>Deteção de APP, Mhyo e PM por PCR</i>	20
2.4.1. <i>Extração de DNA e PCR convencional para o gene endógeno gapdh</i>	20
2.4.2. <i>Deteção dos patógenos por qPCR multiplex</i>	21
2.5. <i>Exame histopatológico e determinação dos escores das lesões microscópicas</i>	24
2.6. <i>Análise estatística</i>	25
3. Resultados	25
3.1. <i>Avaliação dos lotes</i>	25
3.1.1. <i>Achados macroscópicos</i>	25
3.1.2. <i>Achados microscópicos</i>	26
3.2. <i>Prevalência de Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) e Pasteurella multocida (PM) em amostras de pulmão de acordo com o grau de pleurisia</i>	28
3.3. <i>Quantificações de DNA de Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) e Pasteurella multocida (PM) em amostras de pulmão, de acordo com o grau de pleurisia, por qPCR</i>	29
3.4. <i>Correlações entre as quantificações de DNA de Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) e Pasteurella multocida (PM) com o grau de pleurisia, e com o escore de consolidação pulmonar por lobo pulmonar e no pulmão inteiro</i>	30

3.5. Percentual das lesões histológicas nas amostras de pulmão de acordo com o grau de pleurisia	32
3.6. Correlações entre as quantificações de DNA de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (APP), <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Mhyo) e <i>Pasteurella multocida</i> (PM) em amostras de pulmão e os escores das lesões microscópicas.....	34
4. Discussão	35
5. Conclusão	38
Referências	39

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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

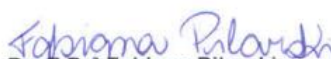


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

A CEUA – FCAV / Unesp Jaboticabal declara estar ciente de que o projeto de pesquisa intitulado **"Determinação etiológica das pleurisias detectadas em suínos no abatedouro"**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, protocolo nº 204/23, realizado empregando amostras de pulmão de suíno obtidas em abatedouro comercial certificado, 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).

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2023.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Categorização anatomopatológica e detecção etiológica em lesões pulmonares de suínos no abate

RESUMO - A intensificação da suinocultura acarretou elevados desafios de controle e prevenção de problemas sanitários, dentre eles se destacam as doenças do complexo respiratório. O monitoramento sanitário no abate é uma ferramenta de controle importante, devido aos elevados desafios sanidade do rebanho. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi identificar os principais agentes etiológicos que causam pleurisia no abate de suínos, uma vez que esta condição causa grande prejuízo econômico no setor. Para tal, foi selecionado um frigorífico localizado no Estado de São Paulo e as carcaças na linha de abate analisadas. As amostras de pleurisia foram classificadas de acordo com o grau da lesão do pulmão e alocadas em cinco scores: G0: pleurisia grau 0 – sem lesões; G1: pleurisia grau 1; G2: pleurisia grau 2; G3: pleurisia grau 3; G4: pleurisia grau 4). Foram coletados 217 fragmentos de pulmão, em duplicata, para a identificação dos seguintes patógenos bacterianos: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM), pela técnica de qPCR. Um exame histopatológico também foi realizado nas amostras a fim de determinar os escores das lesões. Os resultados demonstraram que Mhyo e APP foram os agentes etiológicos mais prevalentes (infecções únicas e coinfeções) nas amostras de pulmões, nos diferentes graus de pleurisia, enquanto que as lesões de broncopneumonia e de hiperplasia BALT foram os achados histopatológicos mais frequentes. Também foram encontradas correlações positivas entre a quantificação de DNA de APP com o grau de pleurisia ($\rho = 0,25386$) e com o grau de consolidação pulmonar em todos os lobos pulmonares ($\rho = 0,18063$ a $\rho = 0,32858$) e no pulmão inteiro ($\rho = 0,38898$).

Palavras-chave: carcaça, doenças respiratórias, pleurite, qPCR, *Sus scrofa domesticus*

Pathological categorization and etiological detection in lung lesions of pigs at slaughter.

ABSTRACT - The intensification of pig farming has led to high challenges in the control and prevention of health problems, among which the diseases of the respiratory complex stand out. Health monitoring at slaughter is an important control tool, due to the high herd health challenges. In this context, the objective of the work was to identify the main etiologic agents that cause pleurisy at the slaughter of pigs. For this purpose, a slaughterhouse located in the State of São Paulo was selected and the carcasses on the slaughter line were analyzed. The pleurisy samples were classified according to the degree of lung lesion and allocated into five score groups: G0: pleurisy grade 0 - no lesions; G1: pleurisy grade 1; G2: pleurisy grade 2; G3: pleurisy grade 3; G4: pleurisy grade 4). A total of 217 lung fragments were collected in duplicate for the identification of the following bacterial pathogens: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) and *Pasteurella multocida* (PM), by qPCR technique. A histopathological examination was also performed on the samples in order to determine the lesion scores. The results showed that Mhyo and APP were the most prevalent etiologic agents (single infections and coinfections) in the lung samples at the different grades of pleurisy, while bronchopneumonia and BALT hyperplasia lesions were the most frequent histopathologic findings. Positive correlations were also found between APP DNA quantification with the degree of pleurisy ($\rho = 0.25386$) and with the degree of lung consolidation in all lung lobes ($\rho = 0.18063$ to $\rho = 0.32858$) and in the whole lung ($\rho = 0.38898$).

Keywords: carcass, respiratory diseases, pleuritis, qPCR, *Sus scrofa domesticus*

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A suinocultura brasileira ocupa um lugar de destaque no contexto mundial, se configurando como o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína (ABPA, 2022), gerando milhares de empregos diretos e indiretos. Entretanto, a modernização da indústria e o aumento da produção trouxeram consigo um crescimento da produtividade e por consequência um aumento da pressão de infecção, em especial ao complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS).

No Brasil, as altas prevalências de lesões pulmonares em suínos no momento de abate revelam uma possível deficiência nas condições sanitárias, de manejo e instalações (TAKEUTI et al., 2017; CONTI et al., 2021). Este complexo, determinado de tríade epidemiológica é resultante da interação de diversos agentes infecciosos, desafios ambientais e das práticas de manejo nas granjas (MERIALDI et al., 2012) sendo fatores de risco importantes para a ocorrência de pneumonias. As lesões pulmonares mais observadas em frigoríficos são resultantes de pneumonias e pleurites (ARAÚJO-BRETAS et al., 2018).

Muitos patógenos circulantes no rebanho pertencem ao Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos e facilitam a disseminação e a ocorrência destas infecções respiratórias. Dentre os agentes do CDRS que se destacam na formação das lesões pulmonares estão *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), *Pasteurella multocida* (PM) e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). A ocorrência das lesões no parênquima pulmonar dos suínos ocorre em decorrência das interações entre os patógenos em si e seu contato com o sistema imune do hospedeiro (THACKER; THACKER et al., 2001).

O *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente primário da pneumonia enzoótica, é uma bactéria pertencente ao Filo *Firmicutes* e classe *Mollicutes*, que, além de possuir um genoma pequeno, ausência de parede celular, contém apenas uma membrana plasmática, sendo sua biologia molecular semelhante a

das bactérias gram-positivas (KOBISCH; FRIIS, 1996; SIMIONATTO et al., 2013).

Já foi constatado por diferentes técnicas como a análise em multilocus de repetições em tandem de número variável - MLVA (*multiple locus variable number tandem repeats analysis*) e sequenciamento genômico completo, que existe um grande número de variantes de cepas de *Mhyo* em todos os países onde a suinocultura tem relevância econômica. Esta variabilidade genética faz com que as cepas apresentem diferentes graus de patogenicidade, podendo ser classificadas como baixa, média e alta (VICCA et al., 2003; THACKER; MINION, 2012; DOS SANTOS et al., 2015; TAKEUTI et al., 2017).

O APP é um agente primário causador da pleuropneumonia suína, uma lesão respiratória caracterizada por broncopneumonia fibrino-hemorrágica e necrosante, com exsudação de fibrina na fase aguda e com formação de nódulos de pneumonia no parênquima pulmonar adjacente na fase crônica (CHIERIS et al., 2010). Nas granjas comerciais podem ser encontrados isolados com diferentes graus de patogenicidade.

Até o momento são reconhecidos 19 sorotipos de APP, os quais compartilham diferentes determinantes antigênicos como as exotoxinas Apx I, II, III e IV (STRINGER et al., 2021), sendo estas determinantes na formação das lesões. *Pasteurella multocida* é considerada um agente secundário nas pneumonias em suínos (ROSS, 2007); quando associada a *Bordetella bronchiseptica* pode causar rinite atrófica progressiva (BLACKALL et al., 2000; SUN et al., 2010).

Portanto, a determinação dos principais agentes etiológicos bacterianos identificados nos casos de lesões pulmonares após o abate pode auxiliar no levantamento dos patógenos associados às lesões e permite a adoção de medidas de controle e prevenção eficazes. A partir dos resultados deste estudo podem servir de base para que medidas de controle possam ser desenvolvidas futuramente.

2. Revisão de Literatura

O complexo das doenças respiratórias dos suínos (CDRS) é um problema sanitário desafiador enfrentado pela suinocultura mundial. Este complexo é resultante da interação de diversos agentes infecciosos, desafios ambientais e das práticas de manejo nas granjas (MERIALDI et al., 2012). As perdas estão relacionadas à mortalidade, piora na conversão alimentar, diminuição do ganho de peso diário, gastos com medicamentos e condenações de carcaças no abate. Entre as causas mais frequentes de condenações de carcaças em suínos abatidos no Brasil estão as lesões pulmonares, especialmente as pneumonias e pleurisias (COLDEBELLA et al., 2018).

Pleurisia é a inflamação da membrana que recobre os pulmões e reveste a cavidade torácica (pleura) (MORES et al., 2017). Fatores de risco como alta densidade animal, mistura de lotes de diferentes origens e falhas de manejo atuam como promotores de infecções por doenças respiratórias e elevam a ocorrência de pleurisias ao abate (NASCIMENTO et al., 2018).

Na fase aguda da pleurisia um exsudato fibrinoso é visível nas superfícies pleurais. Posteriormente, os animais melhoram e a fibrina é transformada em tecido fibroso colagenoso. O diagnóstico de pleurisia em suínos pode ser realizado por meio de monitoria clínica com presença de tosse, espirro ou no abate, por meio da presença de lesões no parênquima pulmonar (ANDREASEN et al., 2001; NASCIMENTO, 2016). Estudos relatam prevalências de 37,6% a 62,3% de pleurisias nos pulmões analisados ao abate (MEYNS et al., 2011; MERIALDI et al., 2012; LIAO et al., 2017).

Segundo Alberton e Mores (2008), aproximadamente 50% dos animais desviados para o Departamento de Inspeção Final (DIF) no abatedouro, apresentam algum tipo de lesão pulmonar. Durante a linha de inspeção, os animais que são identificados com lesões de pleurisias são desviados ao DIF para avaliação, podendo ser destinados para o aproveitamento condicional ou condenação total da carcaça (NASCIMENTO et al., 2018).

No Brasil, a frequência de desvio de carcaças ao abate ao DIF por aderências de pleura é de 3,72% (RIISPOA, 2017). Um estudo realizado por Morés et al. (2017), entre os anos de 2010 a 2014, com dados de um frigorífico da região Sul do Brasil, avaliou as carcaças que foram desviadas ao DIF, e destas, 7,3% apresentaram pleurisias e/ou pericardite.

A forma mais comum de pleurisia encontrada em suínos no abate é a fibrinosa, representando um processo inflamatório agudo. Durante a fase aguda da inflamação, fluidos com uma alta concentração de proteínas acumulam-se no espaço pleural, dando origem a um líquido denominado exsudato. A poliserosite ocasionada por *Glasserella parasuis* (GPS) na doença de Glässer é um exemplo de pleurisia fibrinosa (JÄGER et al., 2012).

Em um estudo realizado na Holanda com 10 rebanhos analisados, a média de prevalência de pleurite foi de 45%, sendo esta localizada nos lobos caudais, área comumente afetada por lesões em casos de pleuropneumonia suína, e 43% dos suínos avaliados apresentaram conjuntamente lesões de pleurisias e pneumonia (JIRAWATTANAPONG et al., 2010).

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) é um patógeno específico de suíno e o agente etiológico da pleuropneumonia suína. Trata-se de uma das mais importantes pneumonias de origem bacteriana para suinocultura mundial, uma vez que esta doença respiratória grave é caracterizada por broncopneumonia fibrino-hemorrágica e necrosante com exsudação de fibrina na fase aguda e aderências firmes de pleura com formação de nódulos de pneumonia no parênquima pulmonar (RUIZ et al., 2006; SASSU et al., 2017).

A bactéria *Pasteurella multocida* (Pm) é considerada um importante microrganismo que faz parte da microbiota residente no trato respiratório dos suínos. A PM é um patógeno comensal da microbiota do trato respiratório superior, sendo que, na maior parte dos casos é considerado um patógeno secundário. Contudo, pode atuar como agente primário causando pneumonia, serosites e pleuropneumonia (OLIVEIRA FILHO, 2014).

As pleurisias podem ser divididas em duas formas: primária e ou secundária. Infecções por GPS e *Streptococcus suis* (*S. suis*) podem resultar em pleurisia primária, enquanto a forma secundária normalmente está associada à pneumonia. Porém, PM tipo A também pode causar lesões primárias nas serosas (OLIVEIRA FILHO, 2014). Já as pleurisias associadas aos nódulos pulmonares são causadas em sua grande maioria por APP (ENOE et al., 2002; FRAILE et al., 2009).

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo), APP e vírus da Influenza A suína (IAV), atuam como agentes primários e predisõem às infecções secundárias causadas por PM, GPS e *S. suis* (YAEGER; VAN ALSTINE, 2019). Entre os

principais agentes bacterianos causadores de pleurisia, destacam-se GPS, PM, APP, *S. suis* e *Bordetella bronchiseptica* (BB); estes podem causar pleurisia fibrinosa aguda ou não, com ou sem pneumonia (CLEVELAND-NIELSEN et al., 2002).

Estudo conduzido no Sul do Brasil avaliou 150 pulmões oriundos de cinco frigoríficos, 68% das amostras apresentava sugestão histopatológica de envolvimento de mais de um tipo de agente infeccioso. Destas amostras lesionadas, 92% apresentavam *Mycoplasma hyopneumoniae* e 89% IAV. (CONTI et al., 2021). Entretanto, existem poucos estudos no Brasil acerca da prevalência DOS principais patógenos respiratórios e suas correlações com as lesões pulmonares ao abate.

Mycoplasma hyopneumoniae é o principal agente da pneumonia enzoótica suína (PES) e também é considerado o patógeno primário envolvido no complexo de doenças respiratórias dos suínos (THACKER; MINION, 2012, TAKEUTI et al., 2017). É encontrado principalmente na superfície da mucosa da traqueia, brônquios e bronquíolos. A interação entre cepas patogênicas e células do hospedeiro durante a colonização é um processo crítico para a patogenia e estabelecimento de infecções por outros patógenos bacterianos (Raymond et al., 2018) como PM, APP, *S. suis* e GPS (THACKER et al., 2001).

Baraldi et al. (2019) avaliaram a soroprevalência de Mhyo em granjas vacinadas no estado de São Paulo, encontrando na terminação uma soroprevalência para Mhyo de 80% e 12% área de consolidação pulmonar e 9% de pleurite no abate, sendo que 79,8% dos animais apresentavam algum grau de consolidação. Já Galdeano et al. (2019), em um estudo sobre a soroprevalência de Mhyo no estado de Goiás, verificaram que, na terminação, 88,36% dos animais foram soropositivos, e, no abate, observaram 7,29% de área de consolidação pulmonar e 10,33% de pleurite. Dos animais abatidos, 80,33% apresentavam algum grau de consolidação pulmonar.

Apesar dos estudos existentes serem de uma abrangência regional, pode-se observar que a PES é endêmica em todas as regiões produtoras do país e causa consideráveis perdas econômicas à atividade. Ferraz et al. (2020) determinaram que para cada 1% de lesão pulmonar há uma diminuição de 1,8 gramas de ganho médio diário, podendo os prejuízos alcançarem US\$ 6,55 por animal abatido.

As cepas de Mhyo possuem uma grande variabilidade genética e patogenicidade (THACKER; MINION, 2012) que podem ser detectadas por meio da análise em multilocus de repetições em tandem de número variável - MLVA (*multiple locus variable number tandem repeats analysis*) (VRANCKX et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2015; PANTOJA et al., 2016; MICHIELS et al., 2017).

Através do estudo de genótipos, também é sabido que a mesma cepa pode estar presente no pulmão do mesmo animal por no mínimo doze semanas, o que indica que a resposta imune do animal não apresenta sucesso em reduzir a infecção (VRANCKX et al., 2011). Esse resultado é comparável a estudos anteriores que demonstram que animais podem permanecer positivos por mais de 200 dias após a infecção (PIETERS et al., 2009).

Em estudo recente, que avaliou amostras do Brasil e de outros países em conjunto, observou-se alta diversidade entre as amostras dos diferentes países avaliados, entre os diferentes estados de cada país e dentro do próprio estado, sendo que nenhum tipo MLVA comum foi encontrado entre as regiões estudadas (DOS SANTOS et al., 2015).

Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira com pneumonias, pleurisias e aderências sejam de R\$216 milhões anuais, sendo que, um quinto das lesões de aderência e pleurisias estão relacionadas a PM, o que resulta aproximadamente em R\$43 milhões anuais (NASCIMENTO, 2016). As lesões pneumônicas sugestivas de PM são frequentemente detectadas nos rebanhos de suínos no Brasil.

A patogenicidade de PM envolve uma série de genes associados à virulência, entre eles, os mais importantes são os que codificam a cápsula de lipopolissacarídeos (LPS); proteína de aquisição de ferro (*hgbA* e *hgbB*); proteínas da membrana externa tóxicas (*toxA*); proteína de adesão bacteriana (*pfha*), leucotoxinas e enzimas que podem estar envolvidas na produção de doença como a hialuronidase e neuraminidase (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; FURIAN et al., 2016).

O diagnóstico das pleurisias nas granjas ainda é um desafio, pois os problemas respiratórios podem não causar sinais clínicos evidentes, de forma que, a visualização da lesão por pleurisia é comumente identificada somente no momento de abate dos animais (ANDREASEN et al., 2001). Conhecer os principais agentes etiológicos que causam pleurisia no abate de suínos permitiria

traçar medidas de controle e mitigar os fatores de riscos, pois o impacto da desta lesão torna-se aparente e ocasiona perdas somente após o abate.

O manejo sanitário adotado pelas granjas e a falta de esclarecimentos sobre os patógenos circulantes no rebanho facilitam a disseminação e ocorrência destas infecções respiratórias. Portanto, a identificação dos principais agentes etiológicos bacterianos nos casos de pleurísias de suínos após o abate pode auxiliar no levantamento de quais patógenos estão associados a este tipo de lesão, na adoção de medidas de controle e prevenção da infecção e no planejamento de um protocolo sanitário mais eficaz dentro das granjas comerciais de suínos.

3. Referências

ARAÚJO BRETAS A, PERDONCINI G, WILLEMANN M (2018) Prejuízos econômicos por condenação de vísceras vermelhas de suínos abatidos em Santa Catarina. **Pubvet**, 12:1-13.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual** (2022). Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2022/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

Alberton GC, Mores MAZ (2008) Interpretação de lesões no abate como ferramenta de diagnóstico das doenças respiratórias dos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae** 36:95-99.

Andreasen M, Mousing J, Thomsen LK (2001) No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. **Preventive Veterinary Medicine** 52:147-161.

Baraldi TG, Cruz NRN, Pereira DA, Galdeano JVB, Gatto IRH, Silva AFD, Panzardi A, Linhares DCL, Mathias LA, Oliveira LG (2019) Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and influenza virus and their relationships with risk factors, clinical signs and lung lesions in pig

farms with one-site production systems in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine** 171:104748.

Biberstein EL, Hirsh DC (2003) Pasteurell. In: Hirsh DC, Zee YC (Eds) **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.127-135.

Blackall PJ, Fegan N, Pahoff JL, Storie GJ, Mcinstosh GB, Cameron RDA, O'Boyle D, Frost AJ, Bará MR, Marr G, Holder J (2000) The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. **Veterinary Microbiology** 72:111-120.

CHIERs, Koen et al. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary research**, v. 41, n. 5, 2010.

Cleveland-Nielsen A, Nielsen EO, Ersbøll AK (2002) Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. **Preventive Veterinary Medicine** 55:121-135.

Coldebella A, Kich JD, Albuquerque, ER, Buosi, RJ (2018) **Avaliação dos dados de abate e condenações/desvios de suínos registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal nos anos de 2012 a 2014**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 131 p. (Documentos, 198).

Conti ER, Takeuti, KL, Schwetz, CI, Bianchi RM, Driemeier D, Barcellos DESN (2021) Agents of pneumonia in slaughtered pigs in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 41: e06669.

Dos Santos LF, Sreevatsan S, Torremorell M, Moreira MAS, Sibila M, Pieters M (2015) Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. **Veterinary Microbiology** 175:374-381.

Enoe C, Mousing J, Schirmer AL, Willeberg P (2002) Infectious and rearing-system related risk factors for chronic pleuritis in slaughter pigs. **Preventive Veterinary Medicine** 54:337-349.

Ferraz, MES., Almeida HMS, Storino GY, Sonalio K., Souza MR, Moura, CAA, Oliveira LG (2020) Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. **Preventive Veterinary Medicine** 182:105091.

Fraile L, Alegre A, López-Jimenez R, Nofrarías M., Segalés J (2009) Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. **The Veterinary Journal** 184:326-333.

Furian TQ, Borges KA, Laviniki V., Rocha SLS, Almeida CN, Nascimento VP, Salle CTP, Moraes HLS (2016) Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine. **Brazilian Journal of Microbiology** 47:210-6.

Jäger HC, Trevelyan JM, Wood JLN, Gareth PP, Williamson S, Strugnell B, Done S, Habernoll H, Palzer A, Tucker A (2012) Factors associated with pleurisy in pigs: a case-control analysis of slaughter pig data for England and Wales. **PLoS One** 7: e29655.

Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, Van Leengoed L, Wisselink, H, Raymakers R, Cruijsen T, Peet-Schwering CVD, Nielen M, Van Nes A (2010) Pleuritis in slaughter pigs: relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. **Research in Veterinary Science** 88:11-15.

Kobisch M, Friis NF (1996) Swine mycoplasmoses. **Revue Scientifique et Technique - Office International des Épizooties** 15:1569-1605.

Liao SW, Lee JJ, Chen F, Lee WC, Wu YC, Hsuan SL, Chen TH (2017) Evaluation of lung scoring system and serological analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. **Pakistan Veterinary Journal** 37:340-344.

PIETERS, Maria et al. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. **Veterinary microbiology**, v. 134, n. 3-4, p. 261-266, 2009.

Merialdi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P (2012) Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of condition and herd risk factors. **The Veterinary Journal** 193:234-9.

Meyns T, Van Steelant J, Rolly E, Dewulf J, Haesebrouck F, Maes D (2011) A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. **The Veterinary Journal** 187: 388-392.

Michiels A, Vrackx K, Piepers S, Sacristán RDP, Arsenakis I, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D (2017) Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. **Veterinary Research** 48:1-14.

Mores MAZ (2006) **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Morés N, Sandi AJ, Hickmann JL (2017) **Impacto econômico das pleurites/pericardites em um abatedouro de suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 7 p. (Comunicado Técnico 545).

Nascimento ERM (2016) **Pleurisia na suinocultura brasileira: avaliação da prevalência no país e estudo da *Pasteurella multocida* como agente causador**. 59 f. Dissertação (Bioexperimentação) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

Nascimento ERM, Zanella R, Santos LF, Ebertz R, Nascimento DF, Ribeiro LM, Zanella EL (2018) Identificação e distribuição dos agentes causadores da pleurisia na suinocultura brasileira. **Acta Scientiae Veterinariae** 46:1590.

Oliveira Filho JX (2014) **Estudo da patogenia e desenvolvimento de métodos de diagnóstico da pasteurelose pneumônica em suínos**. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Pantoja LG, Pettit K, Dos Santos, LF, Tubbs R, Pieters M (2016) *Mycoplasma hyopneumoniae* genetic variability within a swine operation. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 28:175-179.

Raymond BB, Madhkoor R, Schleicher I, Uphoff CC, Turnbull L, Whitchurch CB, Djordjevic SP (2018) Extracellular actin is a receptor for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 8:54.

Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Diário Oficial [da] União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

Ross RF (2007) *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. **Animal Health Research Reviews** 7:13-29.

Ruiz VLA, Gregori F, Bersano JG, Ferraz MIC (2006) **Pleuropneumonia suína**. São Paulo: Instituto Biológico, 1 p. (Comunicado Técnico 36).

Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I (2017) Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. **Transboundary and Emerging Diseases** 65:72-90.

Simionatto S, Marchioro SB, Maes D, Dellagostin OA (2013) *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. **Veterinary microbiology** 165:234-242.

STRINGER, Oliver W. et al. Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. **Veterinary Microbiology**, v. 255, p. 109021, 2021.

Sun D, Wang J, Wu R, Wang C, He X, Zhen J, Yang H (2010) Development of a novel LAMP diagnostic method for visible detection of swine *Pasteurella multocida*. **Veterinary Research Communications** 34:649-657.

Takeuti K L, Barcellos DESN, Andrade CP, Almeida LL, Pieters M (2017) Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. **Veterinary Microbiology** 208:18-24.

Takeuti KL, Barcellos DESN (2017) O que há de novo sobre a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. In: XII Simpósio Internacional de Suinocultura. **Anais**. Porto Alegre: SINSUI, p.111-118.

Thacker E, Thacker B, Janke B (2001) Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology** 39:2525-2530.

Thacker EL, Minion FC (2012) Mycoplasmosis. In: Zimmermann JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.) **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, p.779-797.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, Kruif A, Haesebrouck F (2003) Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology** 97:177-190.

Vranckx K, Maes D, Calus D, Villarreal I, Pasmans F, Haesebrouck F (2011) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. **Journal of Clinical Microbiology** 49:2020-3.

Yaeger MJ, Van Alstine WG (2019) Respiratory System. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J (Eds.) **Diseases of Swine**. 11th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell. Chapter 21, p.393-407.

CAPÍTULO 2 - Categorização anatomopatológica e detecção etiológica em lesões pulmonares de suínos no abate

Laíza Arruda^a, Clarisse Malcher^a, Daniela Gomes da Silva^a, Fernando Moreira Petri^a, Gabriel Yuri Storino^a, Henrique Meiroz de Souza Almeida^a, Karina Sonalio^a, Leonardo Teofilo Toledo^b, Luís Guilherme de Oliveira^{a*}

^aUniversidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

^bUniversidade Federal de Viçosa (UFV), Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), Viçosa, Brasil

Resumo

A intensificação da suinocultura acarretou elevados desafios de controle e prevenção de problemas sanitários, dentre eles se destacam as doenças do complexo respiratório. O monitoramento sanitário no abate é uma ferramenta de controle importante, devido aos desafios sanitários dos rebanhos. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi identificar os principais agentes etiológicos que causam pleurisia no abate de suínos e caracterizar as lesões anatomopatológicas. Para tal, foi selecionado um frigorífico localizado no Estado de São Paulo e as carcaças na linha de abate analisadas. As amostras de pleurisia passaram por um exame histopatológico e foram classificadas de acordo com o grau da lesão do pulmão e alocadas em cinco grupos: G0: pleurisia grau 0 – sem lesões; G1: pleurisia grau 1; G2: pleurisia grau 2; G3: pleurisia grau 3; G4: pleurisia grau 4). Foram coletados 217 fragmentos de pulmão, em duplicata, para a identificação dos seguintes patógenos bacterianos: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM), pela técnica de qPCR. Os resultados demonstraram que Mhyo e APP foram os agentes etiológicos mais prevalentes (infecções únicas e coinfeções) nas amostras de pulmões, nos diferentes graus de pleurisia,

enquanto as lesões de broncopneumonia e de hiperplasia de BALT foram os achados histopatológicos mais frequentes. Também foram encontradas correlações positivas entre a quantificação de DNA de APP com o grau de pleurisia ($\rho = 0,25386$) e com o grau de consolidação pulmonar em todos os lobos pulmonares ($\rho = 0,18063$ a $\rho = 0,32858$) e no pulmão inteiro ($\rho = 0,38898$).

Palavras-chave: *Sus scrofa domesticus*, carcaça, doenças respiratórias, pleurite, qPCR.

1. Introdução

As doenças respiratórias causam grandes perdas econômicas para a suinocultura mundial devido à alta morbidade e mortalidade, piora da conversão alimentar, redução do ganho de peso dos animais e aumento dos gastos com medicamentos (SZEREDI et al., 2015). O complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) é um quadro clínico decorrente da interação de agentes infecciosos virais e bacterianos, intensificado por condições ambientais, genéticas e práticas de manejo (MERIALDI et al., 2012).

Estima-se que as perdas econômicas na cadeia suína brasileira com pneumonias, pleurisias e aderências sejam de R\$216 milhões anuais, sendo que, um quinto das lesões de aderência e pleurisias estão relacionadas a PM, o que resulta aproximadamente em R\$43 milhões anuais (MORES, 2006).

As pleurisias são consideradas lesões multifatoriais, apresentando um quadro de repercussão sistêmica, que comprometem negativamente a eficiência de produção e o bem-estar animal (PAGOT et al., 2007; HOLST et al., 2015). Neste contexto, a pneumonia enzoótica suína (PES) é uma doença crônica infecciosa causada

primariamente por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) que se manifesta clinicamente com uma tosse seca não produtiva (SIBILA et al., 2009; MAES et al., 2018). O impacto econômico pode ser estimado em US\$6,55 por animal abatido (FERRAZ et al., 2020), podendo ser maior quando associada a patógenos secundários.

Pasteurella multocida (PM) tipo A é considerado um agente secundário da PES originalmente causada pelas infecções por Mhyo (PARK et al., 2016; FILHO et al., 2018). Ainda, uma alta relação entre estes dois patógenos que compõem o CDRS foi observada em estudo anterior (PARK et al., 2016). Infecções causadas por cepas patogênicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) são as principais causas de pleurite em suínos, embora outros agentes possam estar envolvidos. Lesões pleuríticas e lesões pneumônicas são encontradas principalmente nas áreas cranioventral do pulmão quando associadas a Mhyo (BARALDI et al., 2019).

As prevalências de lesões pulmonares são relatadas por todo o mundo, evidenciando a importância do monitoramento sanitário e da identificação de tais lesões. Estudos relatam de 37,6% a 62,3% de pleurisias nos pulmões analisados no abate de suínos (MEYNS et al., 2011; MERIALDI et al., 2012; LIAO et al., 2017). Vale ressaltar que lesões associadas ao CDRS são as principais causas de condenação de carcaças em frigoríficos (FABLET et al., 2012; SZEREDI et al., 2015; CONTI et al., 2021). Para estimar a ocorrência e a gravidade das lesões pulmonares ocasionadas pelas doenças respiratórias, o abatedouro é o ponto de escolha para a coleta de dados sobre o status sanitário do rebanho (MEYNS et al., 2011; MERIALDI et al., 2012; ALAWNEH et al., 2018).

. Este estudo assume relevância significativa, uma vez que, até o momento, pesquisas semelhantes não foram realizadas no Brasil. A intensificação da suinocultura e

os desafios relacionados ao controle de problemas sanitários, no que diz respeito às doenças respiratórias, tornam a investigação dos agentes etiológicos da pleurisia de suínos no abate de extrema importância.

Tendo em vista os prejuízos causados pelas doenças respiratórias, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência de detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*, pela técnica de qPCR, em amostras de pulmão com diferentes graus de pleurisia no momento do abate, e investigar a associação desses três agentes etiológicos com as lesões pulmonares microscópicas.

2. Material e Métodos

2.1. Delineamento experimental e coleta das amostras

O estudo foi conduzido num frigorífico de suínos localizado no município de Guariba, Estado de São Paulo, com o fluxo de abate diário de aproximadamente 400 animais, oriundos de diferentes regiões do Brasil, e teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) pelo protocolo n°204/23 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.

Foram avaliadas um total de 1.570 carcaças de suínos durante o acompanhamento do abate, oriundos de sete lotes do estado do Mato Grosso do Sul de diferentes origens e submetidos à avaliação macroscópica, das quais foram selecionadas 217 amostras durante os dias de acompanhamento do abate que apresentaram diferentes graus de pleurisia.

2.2. Coleta de amostras

De cada carcaça selecionada, foram coletados fragmentos de pulmão do conjunto de lobos apical-cardíaco-diafragmático, preconizando a região do interior dos lobos (ao redor dos brônquios) e de lesões presentes no pulmão com auxílio de instrumental esterilizado. As amostras de pulmão foram acondicionadas em microtubos estéreis livres de RNase e DNase (Axygen, EUA) e armazenadas a -20°C até o momento das análises moleculares.

Um segundo fragmento de tecido pulmonar, medindo aproximadamente 3 x 3 cm, foi coletado na área de transição da lesão de consolidação pulmonar, armazenado em frasco devidamente identificado e submerso em solução de formalina tamponada 10% (pH 7,0), na proporção aproximada de 10:1 (formalina: tecido), para análise histopatológica.

2.3. Avaliação macroscópica das carcaças e dos pulmões

2.3.1. Categorização das lesões de pleurisia

As amostras selecionadas foram avaliadas macroscopicamente e divididas em cinco grupos (G0, G1, G2, G3 e G4), de acordo com a avaliação das lesões na pleura, utilizando-se o método descrito por Dottori et al. (2007), conhecido como Sistema de Avaliação de Pleurisia em Abatedouros (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System - SPES) (Tabela 1).

Tabela 1

Método de avaliação do escore de lesão por pleurisias de Dottori et al. (2007).

Escore	Características da pleurisia, considerando a extensão e localização das lesões
0	Sem lesões
1	Pleurisia afetando a porção crânio-ventral do pulmão; adesão interlobular
2	Pleurisia unilateral discreta do lobo diafragmático
3	Pleurisia discreta bilateral de ambos os lobos diafragmáticos; adesão grande e unilateral afetando o lobo diafragmático
4	Grandes aderências bilaterais entre os lobos diafragmáticos de um lado e a parede torácica do outro

2.3.2. Índice para Pneumonia (IPP), porcentagens médias de pleurisias e consolidação pulmonar dos lotes

Também foi feito o cálculo do Índice para Pneumonia (IPP) dos sete lotes avaliados, segundo a metodologia descrita por Piffer e Brito (1991) (Tabela 2), e das porcentagens médias de pleurisias e consolidação pulmonar com auxílio do software Ceva Lung Program[®].

Tabela 2

Escore do grau de consolidação pulmonar de acordo com Piffer e Brito (1991).

Escore	Extensão da lesão de consolidação pulmonar por lobo (% da área pulmonar)
0	Lobo normal, sem consolidação pulmonar

1	<25% da superfície do lobo afetada
2	25 a 50% da superfície do lobo afetada
3	51 a 75% da superfície do lobo afetada
4	>76% da superfície do lobo afetada

2.4 Detecção de APP, Mhyo e PM por PCR

2.4.1. Extração de DNA e PCR convencional para o gene endógeno *gapdh*

A extração de DNA das amostras de pulmão foi realizada *in house* pelo método descrito por Kuramae-Izioka (1997), com modificações (TOLEDO et al., 2016). A mensuração da concentração de DNA foi realizada por meio de espectrofotometria, NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo FisherScientific®, Wilmington, EUA). As amostras que não atingiram a pureza de 1,8 a 2,0 na relação 260/280 foram submetidas novamente à extração de DNA (Bustin et al., 2009). Após a extração, as amostras foram aliquotadas em duplicata e armazenadas a -80°C.

Para verificar a presença de inibidores de qPCR nas amostras de DNA extraídas que pudessem acarretar falsos negativos, todas as amostras foram submetidas à PCR convencional (cPCR) para detecção do gene endógeno *gapdh* de acordo com a metodologia proposta por Birkenheuer et al. (2003), com modificações (TOLEDO et al., 2016). A reação foi composta por 1,0 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Foward: 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3' e Reverse: 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') (Invitrogen, EUA), 1 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen, EUA), solução tampão 1x (Invitrogen, EUA), 0,75 mM de MgCl₂

(Invitrogen, EUA), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (Invitrogen, EUA), água ultrapura q.s.p. para 20 µL e 5 µL de DNA molde, totalizando um volume final de 25 µL. A reação de amplificação consistiu num ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão de 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos em termociclador MyCycler (Bio Rad, EUA). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (SigmaAldrich, EUA) corado com brometo de etídio 0,1% (Sigma-Aldrich, EUA). O gel foi lido no transiluminador ChemiDoc MP (Bio-Rad, EUA). O tamanho do fragmento amplificado foi de 437 pb. Amostras negativas foram novamente submetidas à extração de DNA e cPCR para o gene endógeno *gapdh*.

2.4.2. Detecção dos patógenos por qPCR multiplex

Para a detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* foram utilizados um par de oligonucleotídeos iniciadores e sonda de hidrólise para o gene alvo *omlA* (SUNAGA et al., 2020); para *Mycoplasma hyopneumoniae* o alvo foi o gene que codifica a adesina *p102* (FOUROUR et al., 2018); e para detecção de *Pasteurella multocida* o gene alvo foi o *kmt1* que codifica uma lipoproteína de membrana (GOECKE et al., 2021), como descrito na Tabela 3.

Tabela 3

Sequências de oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas para detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Gene s	Oligonucleotídeos		Amplicon (pb)
	iniciadores e sondas	Sequência (5' → 3')	
<i>omIA</i>	F APP	AGTGCTTACCGCATGTAGTGGC	153
	R APP	TTGGTGCGGACATATCAACCTTA	
		5'-Cy5-	
	P APP	CGATGAACCCGATGAGCCGCC-3'- IB [®] RQ	
<i>p102</i>	F Mhyo	5'-TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC-3'	150
	R Mhyo	5'-AAATTAAAAGCTGTTCAAATGC-3'	
		5'-FAM-	
	P Mhyo	AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-3'- BHQ1	
<i>kmt1</i>	F PM	5'-GGGCTTGTCGGTAGTCTTT -3'	148
		5'-	
	R PM	CGGCAAATAACAATAAGCTGAGTA- 3'	

5'-TexRd-

P PM CGGCGCAACTGATTGGACGTTATT3'

-IB®RQ

A reação de qPCR foi composta por 2 µL da amostra de DNA, 0,4 µM de cada sonda de hidrólise, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1x Master Mix Go taq® (Promega, Madison, EUA) e água ultrapura (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) q.s.p, totalizando 10 µL. As amplificações foram realizadas usando termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®, França) sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 3 minutos a 95 °C, seguido de 39 ciclos a 95 °C por 15 segundos de extensão a 57,2 °C por 30 segundos (PETRI et al., 2023). Todas as amostras foram testadas em duplicata, e os resultados só foram aceitos para aquelas com desvio padrão menor ou igual a 0,5 ciclos (BUSTIN et al., 2009). As amostras com desvio superior a 0,5 foram novamente testadas em triplicata. As curvas dos fluoróforos FAM (alvo *p102*), Cy5 (alvo *omIA*) e TxR (alvo *kmt1*) foram analisadas e os resultados foram visualizados com auxílio do software Bio-Rad CFX Manager Versão 3.0 (Bio-Rad, França).

Para a quantificação absoluta do número de cópias de DNA dos respectivos agentes, diluições seriadas foram feitas para construção da curva-padrão com diferentes concentrações de DNA sintético GBlock® contendo a sequência-alvo ($1,0 \times 10^7$ cópias/µL a $1,0 \times 10^1$ cópias/µL), que também foram utilizados como controles positivos da reação.

2.5. Exame histopatológico e determinação dos escores das lesões microscópicas

Os fragmentos de pulmão foram processados de acordo com protocolo histotécnico padrão para confecção de lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio de luz em busca de lesões sugestivas de pleurisia e pneumonia, em laboratório terceirizado e especializado.

A hiperplasia de tecido linfoide associado aos brônquios (BALT – *Bronchus Associated Lymphoid Tissue*) foi classificada em cinco diferentes graus de acordo com a metodologia adotada por Ross (1999), sendo: ausente (0); aumento difuso leve de linfócitos nos tecidos peribronquial, peribronquiolar e perivascular (+); aumento difuso moderado de linfócitos e/ou presença de alguns nódulos linfoides (++); número marcado de nódulos linfoides (+++); ou número extenso de nódulos linfoides que afetam a maior parte da seção pulmonar avaliada (++++).

De acordo com Hansen et al. (2010), as broncopneumonias foram classificadas em agudas, subagudas e crônicas. As lesões agudas foram aquelas com neutrófilos como tipo de célula inflamatória dominante, presença de edema extenso e/ou exsudato de fibrina. As lesões subagudas foram caracterizadas de acordo com a infiltração celular dominada por neutrófilos, combinados com hiperplasia moderada de BALT como a única lesão crônica. Já as lesões crônicas foram classificadas por fibroplasias, hiperplasia de BALT de grau ++ a +++, hiperplasia do epitélio brônquico ou bronquiolar, hipertrofia do músculo liso, que é a camada ao redor dos bronquíolos, ductos alveolares e infiltrados celulares constituídos principalmente de linfócitos e células plasmáticas. As pneumonias também foram classificadas em: necrotizante, supurativa, não supurativa ou mista (PORS et al., 2011).

2.6. Análise estatística

O índice para pneumonia (IPP) e as porcentagens médias de pleurisias e consolidação pulmonar de cada lote foram determinados com auxílio do software Ceva Lung Program[®]. Na análise estatística foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar normalidade dos dados. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre pares de médias. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. A correlação entre pares de variáveis foi realizada por meio da aplicação do coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). O software R versão 3.5.1 foi utilizado para análise dos dados.

3. Resultados

Neste estudo, foram avaliadas um total de 1.570 carcaças de suínos durante o acompanhamento do abate, oriundos de sete lotes do estado do Mato Grosso do Sul. Durante o processo de coleta, foram selecionadas 217 amostras, submetidas a exames histopatológico e qPCR.

3.1. Avaliação dos lotes

3.1.1 Achados macroscópicos

Como pode ser observado na Tabela 4, os valores de IPP variaram de 1,01% (lote 2) a 6,58% (lote 6) entre os sete lotes avaliados. A porcentagem de pleurisias variou de 7,82% (lote 4) a 14,52% (lote 6) e a porcentagem de consolidação pulmonar variou de

4,61% (lote 2) até 44,4% (lote 7). Todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre os lotes ($p < 0,05\%$).

Tabela 4

Índice para pneumonia (IPP), porcentagens médias de pleurisias e consolidação pulmonar dos sete lotes avaliados com auxílio do software Ceva Lung Program®.

Parâmetros	Lotes						
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7
Nº de carcaças avaliadas	174	217	121	294	358	241	165
Índice para Pneumonia (IPP)	2,93 ^e	1,01 ^g	2,40 ^f	3,16 ^d	4,75 ^c	6,58 ^a	5,77 ^b
% de pleurisias	11,5 ^d	10,1 ^f	12,4 ^b	7,82 ^g	10,9 ^e	14,5 ^a	12,1 ^c
% de consolidação pulmonar	5,75 ^f	4,61 ^g	5,78 ^e	21,0 ^d	29,9 ^c	44,4 ^a	43,9 ^b

Médias seguidas de letras iguais numa mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.1.2 Achados microscópicos

Dentre os achados microscópicos destacaram-se a broncopneumonia aguda mista 53,3% (120 amostras), broncopneumonia aguda supurativa 22,1% (48 amostras) e hiperplasia epitelial 16,6% (36 amostras). Em se tratando da hiperplasia de BALT, lesão

característica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* apenas 1,84% (4 amostras) das amostras de pulmão avaliadas não apresentaram nenhum grau de BALT (Tabela 5).

Tabela 5

Achados histopatológicos em 217 amostras de pulmão dos sete lotes avaliados.

Lesão histológica	%
Pneumonia necrotizante (PN)	1,84% (4/217)
Broncopneumonia aguda supurativa (BPAS)	22,1% (48/217)
Broncopneumonia aguda mista (BPAM)	55,3% (120/217)
Broncopneumonia aguda não supurativa (BPANS)	8,76% (19/217)
Broncopneumonia subaguda (BPSUB)	0,92% (2/217)
Broncopneumonia crônica (BPCR)	2,30% (5/217)
Hiperplasia epitelial (HEP)	16,6% (36/217)
BALT	
0	1,84% (4/217)
+	41,8% (89/213)
++	31,0% (66/213)
+++	22,5% (48/213)
++++	4,69% (10/213)
Total pontuado entre + a ++++	98,2% (213/217)

BALT: hiperplasia de tecido linfoide associado aos brônquios; a hiperplasia BALT foi classificada como ausente (0), leve (+), moderada (++), marcada (+ + +) ou extensa (+ + + +).

3.2. Prevalência de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão de acordo com o grau de pleurisia

Das 217 amostras avaliadas, 97,7% (212/217) foram positivas para Mhyo, 46,1% para APP e 22,1% para PM isoladamente. Para as coinfeções, 45,6% (99/217) foram positivas para APP e Mhyo, 21,7% para Mhyo e PM, 10,1% (22/217) para APP e PM e 10,1% (22/217) foram positivas para os três agentes simultaneamente.

Quanto aos graus de pleurisia, os maiores percentuais de amostras de pulmão positivas para APP, Mhyo e PM isoladamente foram observados no G2 (65,8%; 25/38), G4 (100%; 28/28) e G1 (22,0%; 9/41), respectivamente.

Tabela 6

Porcentagens de amostras de pulmão positivas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) e para respectivas coinfeções por APP e Mhyo (i), APP e PM (ii), Mhyo e PM (iii) e pelos três agentes (iv), pela técnica de qPCR, nos grupos experimentais classificados de acordo com o grau de pleurisia (G0 a G4).

Grupo	APP	Mhyo	PM	(i)	(ii)	(iii)	(iv)
G0	31,7%	95,1%	22,0%	31,7%	9,76%	22,0%	9,76%
	(13/41)	(39/41)	(9/41)	(13/41)	(4/41)	(9/41)	(4/41)
G1	31,1%	98,4%	26,2%	31,1%	9,83%	24,6%	9,83%
	(19/61)	(60/61)	(16/61)	(19/61)	(6/61)	(15/61)	(6/61)
G2	65,8%	97,4%	18,4%	63,2%	10,5%	18,4%	10,5%

	(25/38)	(37/38)	(7/38)	(24/38)	(4/38)	(7/38)	(4/38)
G3	55,1%	98,0%	22,4%	55,1%	10,2%	22,4%	10,2%
	(27/49)	(48/49)	(11/49)	(27/49)	(5/49)	(11/49)	(5/49)
G4	57,1%	100%	17,9%	57,1%	10,7%	17,9%	10,7%
	(16/28)	(28/28)	(5/28)	(16/28)	(3/28)	(5/28)	(3/28)

G0: pleurisia grau 0 – sem lesões; G1: pleurisia grau 1; G2: pleurisia grau 2; G3: pleurisia grau 3; G4: pleurisia grau 4.

3.3. Quantificações de DNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão, de acordo com o grau de pleurisia, por qPCR

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as quantificações de DNA de APP, Mhyo e PM nas amostras de pulmão dos grupos experimentais classificados de acordo com o grau de pleurisia ($p>0,05$) (Tabela 7). Em relação às coinfeções, houve predomínio da associação de APP e Mhyo nas amostras do G2 (63,2%; 24/38), G3 (55,1%; 27/49) e G4 (57,1%; 16/28) seguida pela associação de Mhyo e PM nas amostras do G1 (24,6%; 15/61), G3 (22,4%; 11/49) e G0 (22,0%; 9/41) (Tabela 6).

Maiores valores de medianas das quantificações de DNA de APP e Mhyo foram observados no G2 (APP: $1,96 \times 10^0$ cópias/ μ l; Mhyo: $6,96 \times 10^2$ cópias/ μ l). Em todos os grupos avaliados os valores da mediana para PM foi de $0,00 \times 10^0$ cópias/ μ l.

Tabela 7

Mediana (Intervalo Interquartil - IQ) das quantificações de DNA (cópias/ μ l) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão, pela técnica de qPCR, dos grupos classificados de acordo com o grau de pleurisia (G0 a G4).

Grupo	APP (IQ)	Mhyo (IQ)	PM (IQ)
G0	0,00 x 10 ^{0 a} (7,29 x 10 ⁻¹)	2,20 x 10 ^{2 a} (8,19 x 10 ²)	0,00 x 10 ^{0 a} (0,00 x 10 ⁰)
G1	0,00 x 10 ^{0 a} (5,22 x 10 ⁻¹)	6,82 x 10 ^{2 a} (2,48 x 10 ³)	0,00 x 10 ^{0 a} (1,45 x 10 ⁻¹)
G2	1,96 x 10 ^{0 a} (1,58 x 10 ¹)	6,96 x 10 ^{2 a} (4,48 x 10 ³)	0,00 x 10 ^{0 a} (0,00 x 10 ⁰)
G3	3,41 x 10 ^{-1 a} (2,15 x 10 ¹)	5,75 x 10 ^{2 a} (2,48 x 10 ³)	0,00 x 10 ^{0 a} (0,00 x 10 ⁰)
G4	1,86 x 10 ^{0 a} (2,31 x 10 ¹)	2,42 x 10 ^{2 a} (3,00 x 10 ³)	0,00 x 10 ^{0 a} (0,00 x 10 ⁰)

Medianas seguidas de letras iguais numa mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

3.4. Correlações entre as quantificações de DNA de Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) e Pasteurella multocida (PM) com o grau de pleurisia, e com o escore de consolidação pulmonar por lobo pulmonar e no pulmão inteiro

Observou-se uma correlação positiva significativa entre a quantificação de DNA para APP e o grau de pleurisia ($\rho = 0,25386$) e correlações positivas significativas entre a quantificação de DNA para APP e o grau de consolidação pulmonar em todos os lobos pulmonares ($\rho = 0,18063$ a $\rho = 0,32858$) e no pulmão inteiro ($\rho = 0,38898$) (Tabela 8).

Tabela 8

Coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e valor de p entre as quantificações de DNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão com o grau de pleurisia e com o escore de consolidação pulmonar por lobo pulmonar e no pulmão inteiro.

Análise	APP	Mhyo	PM
Grau de pleurisia	$\rho = 0,25386$ $p = 0,0002$	$p = 0,3970$	$p = 0,6397$
AD	$\rho = 0,18063$ $p = 0,0089$	$p = 0,4831$	$p = 0,6875$
CD	$\rho = 0,23462$ $p = 0,0006$	$p = 0,9683$	$p = 0,3947$
DD	$\rho = 0,30656$ $p < 0,0001$	$p = 0,4296$	$p = 0,6219$
AE	$\rho = 0,23878$ $p = 0,0005$	$p = 0,3903$	$p = 0,4809$
CE	$\rho = 0,32858$ $p < 0,0001$	$p = 0,6349$	$p = 0,5171$
DE	$\rho = 0,26033$ $p = 0,0001$	$p = 0,4273$	$p = 0,4289$
I	$\rho = 0,23834$ $p = 0,0005$	$p = 0,1034$	$p = 0,6478$
Pulmão inteiro	$\rho = 0,38898$ $p = <0,001$	$p = 0,5289$	$p = 0,3509$

AD: apical direito; CD: cardíaco direito, DD: diafragmático direito; AE: apical esquerdo; CE: cardíaco esquerdo; DE: diafragmático esquerdo; I: intermediário.

3.5. Percentual das lesões histológicas nas amostras de pulmão de acordo com o grau de pleurisia

Dentre os achados microscópicos, de acordo com o grau de pleurisia, o G4 apresentou maior percentual de lesões de broncopneumonia aguda mista (75,0%; 21/28) e o G1 os maiores percentuais de broncopneumonia aguda supurativa (29,5%; 18/61) e hiperplasia epitelial (21,3%; 13/61). Independentemente do grau de pleurisia, hiperplasia BALT foi observada entre 96,4% e 100% das amostras de pulmão (Tabela 9).

Tabela 9

Achados histopatológicos em 217 amostras de pulmão de acordo com o grau de pleurisia (G0 a G4).

Lesão histológica	%				
	G0	G1	G2	G3	G4
PN	0%	3,28%	2,63%	2,04%	0%
	(0/41)	(2/61)	(1/38)	(1/49)	(0/28)
BPAS	9,76%	29,5%	23,7%	26,5%	14,3%
	(4/41)	(18/61)	(9/38)	(13/49)	(4/28)
BPAM	48,8%	55,7%	55,3%	49,0%	75,0%
	(20/41)	(34/61)	(21/38)	(24/49)	(21/28)

BPANS	17,1%	3,28%	7,89%	12,2%	3,57%
	(7/41)	(2/61)	(3/38)	(6/49)	(1/28)
BPSUB	0%	1,64%	0%	0%	3,57%
	(0/41)	(1/61)	(0/38)	(0/49)	(1/28)
BPCR	2,44%	0%	5,26%	4,08%	0%
	(1/41)	(0/61)	(2/38)	(2/49)	(0/28)
HEP	4,88%	21,3%	21,1%	16,3%	17,9%
	(2/41)	(13/61)	(8/38)	(8/49)	(5/28)
BALT					
0	2,44%	3,28%	0%	0%	3,57%
	(1/41)	(2/61)	(0/38)	(0/49)	(1/28)
+	65,0%	44,1%	15,8%	42,9%	37,0%
	(26/40)	(26/59)	(6/38)	(21/49)	(10/27)
++	25,0%	30,5%	55,3%	20,4%	25,9%
	(10/40)	(18/59)	(21/38)	(10/49)	(7/27)
+++	10,0%	18,6%	23,7%	30,6%	33,3%
	(4/40)	(11/59)	(9/38)	(15/49)	(9/27)
++++	0%	6,78%	5,26%	6,12%	3,70%
	(0/40)	(4/59)	(2/38)	(3/49)	(1/27)
Total					
pontuado	97,6%	96,7%	100%	100%	96,4%
entre + a	(40/41)	(59/61)	(38/38)	(49/49)	(27/28)
++++					

PN: pneumonia necrotizante; BPAS: broncopneumonia aguda supurativa; BPAM: broncopneumonia aguda mista; BPANS: broncopneumonia aguda não supurativa;

BPSUB: broncopneumonia subaguda; BPCR: broncopneumonia crônica; HEP: hiperplasia epitelial; BALT: tecido linfóide associado aos brônquios; a hiperplasia BALT foi classificada como ausente (0), leve (+), moderada (++), marcada (+ + +) ou extensa (+ + + +).

3.6. Correlações entre as quantificações de DNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão e os escores das lesões microscópicas

Notou-se uma correlação negativa significativa entre a quantificação de APP e lesões de BPAS ($\rho = -0,19$) e correlações positivas significativas entre a quantificação de APP e lesões de BPAM ($\rho = 0,15$), quantificação de Mhyo e lesões de PN ($\rho = 0,15$), quantificação de Mhyo e lesões de BPAS ($\rho = 0,16$) e quantificação de PM e BPCR ($\rho = 0,15$) (Tabela 10).

Tabela 10

Coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e valor de p entre as quantificações de DNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Pasteurella multocida* (PM) em amostras de pulmão e as lesões histopatológicas.

Lesão histológica	APP	Mhyo	PM
PN	p = 0,57	$\rho = 0,15$ p = 0,0339	p = 0,12

BPAS	rho = -0,19 p = 0,049	rho = 0,16 p = 0,0225	p = 0,38
BPAM	rho = 0,15 p = 0,0242	p = 0,57	p = 0,83
BPANS	p = 0,65	p = 0,34	p = 0,94
BPSUB	p = 0,21	p = 0,75	p = 0,46
BPCR	p = 0,25	p = 0,23	rho = 0,15 p = 0,0307
HEP	p = 0,20	p = 0,16	p = 0,11
BALT	p = 0,28	rho = 0,13 p = 0,0533	p = 0,40

PN: pneumonia necrotizante; BPAS: broncopneumonia aguda supurativa; BPAM: broncopneumonia aguda mista; BPANS: broncopneumonia aguda não supurativa; BPSUB: broncopneumonia subaguda; BPCR: broncopneumonia crônica; HEP: hiperplasia epitelial; BALT: tecido linfoide associado aos brônquios.

4. Discussão

O sistema de produção de suínos é caracterizado por uma produção intensiva, com grande concentração de animais em espaços reduzidos. Essa forma de produção é adotada para atender à demanda crescente por carne suína, que é uma fonte de proteína animal muito consumida no país e no mundo. No entanto, esse sistema de produção pode resultar na alta prevalência de agentes patogênicos relacionados ao complexo de doenças respiratórias dos suínos. Dentre as causas mais frequentes de condenações de carcaças de suínos abatidos destacam-se as lesões pulmonares, especialmente as pneumonias e

pleurisias, geralmente causadas pela interação entre vários agentes etiológicos (OPRIESSNIG et al., 2011; COLDEBELLA et al., 2018).

No presente estudo, foi possível identificar a presença de APP, Mhyo e PM nas amostras de pulmão com diferentes graus de pleurisias, principalmente dos dois primeiros agentes etiológicos. Os sete lotes avaliados apresentaram IPP de grau grave ($>1,0$), indicando a presença de uma lesão que pode representar uma ameaça para o rebanho (BRITO et al., 1990; DALLA COSTA et al., 2000; VALENÇA et al., 2016).

Mycoplasma hyopneumoniae é o principal agente da pneumonia enzoótica suína e é considerado o patógeno primário envolvido no complexo de doenças respiratórias dos suínos (THACKER; MINION, 2012, TAKEUTI et al., 2017), enquanto *Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente etiológico da pleuropneumonia suína (RUIZ et al., 2006; SASSU et al., 2017).

Amostras de pulmão do G2 e do G4 apresentaram maior frequência de diagnóstico de APP e Mhyo, respectivamente. Ademais, nesses mesmos grupos houve o predomínio da associação entre esses dois agentes que são os patógenos bacterianos primários mais importantes na etiologia das lesões pulmonares (FRAILE et al., 2010). Com relação às quantificações de DNA pela técnica de qPCR, o G2 também apresentou maiores valores para APP e Mhyo. Por outro lado, as quantificações de DNA de PM foram muito baixas ou nulas nos diferentes graus de pleurisia.

Pasteurella multocida é considerada um agente secundário nas pneumonias em suínos (ROSS, 2007) e sua importância na patogenia das lesões de pneumonias está relacionada às altas taxas de prevalência desse agente nos rebanhos (PARK et al., 2016), fato não observado no presente estudo, apesar da interação com Mhyo ter sido a segunda coinfeção de maior ocorrência. No entanto, é possível inferir que a baixa ocorrência da

bactéria pode ser resultado de uma combinação de fatores biológicos, imunológicos, ambientais e de manejo que influenciam a epidemiologia e a patogenia dessa infecção em suínos (Cid, D. et al., 2019).

Observou-se correlações positivas entre a quantificação de DNA de APP com o grau de pleurisia e com o grau de consolidação pulmonar. As pleurisias são consideradas lesões multifatoriais, que podem se manifestar de forma grave nos casos de coinfeções, havendo relação entre o grau de pleurisia com a prevalência do patógeno (TURNI et al., 2021). Infecções experimentais com Mhyo em associação com APP ou PM resultaram em agravamento das lesões em comparação com as infecções individuais (AMASS et al., 1994; MAROIS et al., 2009).

Os achados histopatológicos mais observados nas amostras de pulmão foram a hiperplasia de BALT (todos os grupos), broncopneumonia aguda mista (G4), broncopneumonia aguda supurativa e hiperplasia epitelial (G1). Microscopicamente, as principais lesões associadas à presença de Mhyo são broncopneumonia, caracterizada por grande infiltrado de neutrófilos, linfócitos e macrófagos no lúmen, e hiperplasia de tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) (HILLEN et al., 2014). A presença de APP está relacionada à pleuropneumonia fibrino-hemorrágica-necrotizante (TOBIAS et al., 2014) enquanto a presença de PM à pleuropneumonia necrosupurativa (NASCIMENTO, 2016).

As lesões de pneumonia associadas à infecção por Mhyo são as mais comumente detectadas em abatedouros de suínos, estimando-se uma prevalência mundial entre 19% a 79% (FABLET et al., 2012). Infecções apenas com Mhyo levam a quadros de broncopneumonia, entretanto, quando há coinfeções com outros patógenos primários (como APP) ou secundários (como PM) ocorre broncopneumonia supurativa, que está associada às pleurisias (ZACHARY, 2017).

Este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, foi conduzido em um único frigorífico de suínos do estado de São Paulo (SP), o que limita a generalização dos resultados para outras regiões e sistemas de produção. Além disso, os animais avaliados eram exclusivamente do estado do Mato Grosso do Sul, reduzindo a representatividade para outras regiões do Brasil.

Com base nos resultados encontrados, sugere-se realizar futuras pesquisas sobre o impacto econômico desses agentes infecciosos em suínos. Avaliar os custos gerados pelas infecções respiratórias afetam a produção e assim auxiliar na implementação de medidas mais efetivas de controle.

De acordo com os dados obtidos, as infecções por Mhyo são mais frequentes, visto que é um agente de grande prevalência nas granjas brasileiras, portanto medidas de controle e prevenção para este agente devem ser intensificadas.

5. Conclusão

Mhyo e APP foram os agentes mais prevalentes (infecções únicas e coinfeções) nas amostras de pulmões, nos diferentes graus de pleurisia, enquanto as lesões de broncopneumonia e de hiperplasia de BALT foram os achados microscópicos mais frequentes. Também foram encontradas correlações positivas entre a quantificação de DNA de APP com o grau de pleurisia e com o grau de consolidação pulmonar.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesse neste estudo.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao frigorífico Frigmel - Guariba/SP e à equipe do Laboratório de Medicina de Suínos da FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Este estudo foi financiado com bolsa de Mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

Alawneh, J.I., Parke, C.R., Lapuz, E.J., David, J.E., Basinang, V.G., Baluyut, A.S., Barnes, T.S., Villar, E.C., Lopez, M.L., Meers, J., Blackall, P.J., 2018. Prevalence and risk factors associated with gross pulmonary lesions in slaughtered pigs in smallholder and commercial farms in two provinces in the Philippines. *Front. Vet. Sci.* 05, <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00007>.

Amass, S., Clark, L., Van Alstine, W., Bowersock, T., Murphy, D., Knox, K., Albregts, S., 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 102-107.

Baraldi, T.G., Cruz, N.R.N., Pereira, D.A., Galdeano, J.V.B., Gatto, I.R.H., Silva, A.F.D., Panzardi, A., Linhares, D.C.L., Mathias, L.A., de Oliveira, L.G., 2019. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and influenza virus and their relationships with risk factors, clinical signs and lung lesions in pig farms with one-site production systems in Brazil. *Prev. Vet. Med.* 171, 104748. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104748>.

Birkenheuer, A.J.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41 (9), 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.

Brito, J.R., Piffer, I.A., Brito, M.A.V., Sobestiansky, J., 1990. Formulação de um índice (IRA) para aplicação na caracterização e classificação de rebanhos com rinite atrófica. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico 160.

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

Cid D, Fernández-Garayzábal JF, Pinto C, Domínguez L, Vela AI. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from sheep and pigs in Spain - Short communication. Acta Vet Hung. 2019 Dec;67(4):489-498. doi: 10.1556/004.2019.048. PMID: 31842595.

Coldebella, A., Kich, J.D., Albuquerque, E.R., Buosi, R., 2018. Avaliação dos dados de abate e condenações/desvios de suínos registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal nos anos de 2012 a 2014. Embrapa Suínos e Aves. Documentos 198.

Conti E.R., Takeuti, K.L., Schwetz, C.I, Bianchi R.M., Driemeier D., Barcellos D.E.S.N. (2021) Agents of pneumonia in slaughtered pigs in southern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 41: e06669.

Dalla Costa, O.A., Mores, N., Sobestiansky, J., Barioni Junior, W., Piffer, I.A., Paiva, D.P., Amaral, A.L., Guzzo, R., Lima, G.J.M.M., Perdomo, C.C., 2000. Fatores de risco associados à rinite atrofica progressiva e pneumonias crônicas nas fases de crescimento e terminação. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico 267.

Dottori, M., Nigrelli, A.D., Bonilauri, P., Merialdi, G., Gozio, S., Cominotti, F., 2007. Proposta di un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione: la griglia S.P.E.S. (*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*). Large Anim. Rev. 13, 161-165.

Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J.P., Le Devendec, L., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. Res. Vet. Sci. 93, 627-630. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.11.002>.

Ferraz, M.E.S., Almeida, H.M.S., Storino, G.Y., Sonalio, K., Souza, M.R., Moura, C.A.A., Costa, W.M.T., Lunardi, L., Linhares, D.C.L., Oliveira, L.G., 2020. Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. Prev. Vet. Med. 182, 105091. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105091>.

Fourour, S., Fablet, C., Tocqueville, V., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Kempf, I., Marois-Créhan, C.A., 2018. A new multiplex real-time TaqMan[®] PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. J. App. Microbiol. 125, 345-355. <https://doi.org/10.1111/jam.13770>.

Fraile, L.; Alegre, A.; López Jiménez, R.; Nofrarías, M.; Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio ventral pulmonary consolidation in slaughter aged pigs. Vet. J. 184, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.029>.

Goecke, N.B., Nielsen, B.H., Petersen, M.B., Larsen, L.E., 2021. Design of a high-throughput real-time PCR system for detection of bovine respiratory and enteric pathogens. Front. Vet. Sci. 24, 677993. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.677993>.

Hansen, M.S., Pors, S.E., Jensen, H.E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E.M., Nielsen, O.L., 2010. An investigation of the pathology and pathogens associate with porcine respiratory disease complex in Denmark. J. Comp. Pathol. 143, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.012>

Hillen, S., von Berg, S., Köhler, K., Reinacher, M., Willems, H., Reiner, G., 2014. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. Prev. Vet. Med. 113 (4), 580-588. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.012>.

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. J. Swine Health Prod. 23, 321-330.

Kuramae-Izioka, E.E., 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. Rev. UNIMAR 19 , 683-689.

Liao, S.W., Lee, J.J., Chen F., Lee W.C., Wu Y.C., Hsuan S.L., Kuo C.J., Chang, Y.C.; Chen, T.H., 2017. Evaluation of lung scoring system and serological analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. Pak. Vet. J. 37 , 340-344.

Maes, D., Chiers, K., Haesebrouck, F., Laevens, H., Verdonck, M., Kruif, A., 2001. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.* 32, 409-419. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001133>.

Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segalés, J., Haesebrouck, F., Pieters, M., 2018. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (Suppl1), 110–124. <https://doi.org/10.1111/tbed.12677>.

Marois, C., Gottschalk, M., Morvan, H., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M., 2009. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 135 (3-4), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.061>.

Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., Martelli, P., 2012. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of condition and herd risk factors. *Vet. J.* 193, 243-239. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.009>.

Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Maes, D., 2011. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet J.* 187, 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.027>.

Mores, M.A.Z., 2006. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 93p.

Nascimento, E.R.M., 2016. Pleurisia na suinocultura brasileira: avaliação da prevalência no país e estudo da *Pasteurella multocida* como agente causador. Dissertação de Mestrado em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 59p.

Pagot, E., Pommier, P., Keïta, A., 2007. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. *Revue Méd. Vét.* 158, 253-259.

Park, C., Jeong, J., Kang, I., Choi, K., Park, S.J., Chae, C., 2016. Increased fucosyl glycoconjugate by *Mycoplasma hyopneumoniae* enhances adherences of *Pasteurella multocida* type A in the ciliated epithelial cells of the respiratory tract. *BMC Vet. Res.* 12, 25. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0650-7>.

PETRI, Fernando Antônio Moreira et al. Associations between Pleurisy and the Main Bacterial Pathogens of the Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC). **Animals**, v. 13, n. 9, p. 1493, 2023.

Piffer, I.A., Brito, J.R.F., 1991. Descrição 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. Documento 23.

Pors, S.E., Hansen, M.S., Bisgaard, M., Jensen, H.E., 2011. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.* 150 (1-2), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.005>.

Ross, R.F., 1999. Mycoplasmal Diseases. *Diseases of Swine*, pp.495-509.

Ross, R.F., 2007. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Anim. Health Res. Rev.* 7, 13-29. doi: <https://doi.org/10.1017/S1466252307001211>.

Ruiz, V.L.A., Gregori, F., Bersano, J.G., Ferraz, M.I.C., 2006. Pleuropneumonia suína. Instituto Biológico. Comunicado Técnico 36.

Sassu, E.L., Bossé, J.T., Tobias, T.J., Gottschalk, M., Langford, P.R., Hennig-Pauka, I., 2017. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (Suppl1), 72-90. <https://doi.org/10.1111/tbed.12739>.

Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020>

Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T., 2020. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 82 (2), 217-223. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0063>.

Szeredi, L., Cságola, A., Dán, Á., Dencső, L., 2015. Vascular lesions and pneumonia in a pig fetus infected by porcine circovirus type 2. *Acta Vet. Hung.* 63, 215–222. <https://doi.org/10.1556/004.2015.019>.

Takeuti, K.L., Barcellos, D.E., Andrade, C.P., Almeida, L.L., Pieters, M., 2017. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. Vet. Microbiol., 208, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.007>.

Thacker, E.L., Minion, C., 2012. Mycoplasmosis. Diseases of Swine, pp. 779–808.

Tobias, T.J., Klinkenberg, D., Bouma, A., Van Den Broek, J., Daemen, A.J.J. M., Wagenaar, J.A., Stegeman, J.A., 2014. A cohort study on *Actinobacillus pleuropneumoniae* colonisation in suckling piglets. Prev. Vet. Med. 114, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.008>.

Toledo, M.A, Leite, A.I, Gonçalves, L.R., Sousa, K.C.M., Silva, A.R.B, Machado, R.Z., André, M.R., 2016. Alta ocorrência de infecção por *Mycoplasma suis* em rebanhos suínos de granjas não tecnificadas em Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 25, 414–417. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016084>.

Turni, C., Meers, J., Parke, K., Singh, R., Yee, S., Templeton, J., Mone, N.K., Blackall, P.J., Barnes, T.S., 2021. Pathogens associated with pleuritic pig lungs at an abattoir in Queensland Australia. Aust. Vet. J., v. 99, 163-171. <https://doi.org/10.1111/avj.13058>.

Valença, A.M.F., Baptista, R.I.A.A., Barbosa, C.N., 2016. Índice para pneumonia em granjas comerciais de suínos do estado de Pernambuco. Medicina Veterinária (UFRPE) 10, 13-18.

Zachary, J.F, 2017. Mechanisms of microbial infections. Pathologic Basis of Veterinary Disease, pp.132-241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00004-7>.