

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO  
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

KÊNIA DE FÁTIMA CARRIJO

DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E  
CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM TECIDOS PULMONAR, RENAL E LINFÓIDE  
E DE *Leptospira* spp. EM SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO  
SANITÁRIA

UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE

NITERÓI/RJ

2012

KÊNIA DE FÁTIMA CARRIJO

DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM TECIDOS PULMONAR, RENAL E LINFÓIDE E DE *Leptospira* spp. EM SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. ROGERIO TORTELLY - UFF

Co-Orientador: Prof. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO - UFF

Niterói/RJ

2012

C316

Carrijo, Kênia de Fátima  
Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* e  
Circovirus Suíno tipo 2 em tecidos pulmonar, renal e  
linfóide e de *Leptospira* spp. em suínos abatidos sob  
inspeção sanitária/Kênia de Fátima Carrijo; orientador  
Rogerio Tortelly. – 2012.  
153f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e  
Processamento Tecnológico de Produtos de Origem  
Animal)– Universidade Federal Fluminense, 2012.  
Orientador: Rogerio Tortelly

1. Diagnóstico Veterinário. 2. Inspeção sanitária.  
3. Pneumonia Suína Micoplasmica. 5. Leptospirose em  
suíno. 6. Histopatologia. 7. Circovírus. I. Título.

CDD 636.0896075


**KÊNIA DE FÁTIMA CARRIJO**

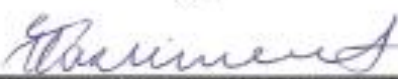
**DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM  
TECIDOS PULMONAR, RENAL E LINFÓIDE E DE *Leptospira* sp. DE SUÍNOS  
ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

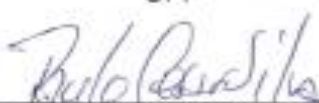
Aprovada em 27 de abril de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ROGÉRIO TORTELLY – Orientador  
UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO – Co-orientador  
UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. IACIR FRANCISCO DOS SANTOS  
UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. PAULO CÉSAR SILVA  
UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO DE ARRUDA PINTO  
UFV

Niterói - RJ  
2012

Aos meus amados pais Jales e Margarida,  
que sempre estiveram presentes, incentivando e auxiliando na minha formação.  
Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que seguirei em frente.

À minha irmã Cássia, que continuará sempre presente em minha vida, pois  
estaremos eternamente unidas por laços de amor.

Ao meu namorado Cristiano, por todo seu amor, apoio e incentivo.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, criador de todas as coisas, por ter me dado primeiramente a vida; por ter me proporcionado a abençoada oportunidade de conhecer e conviver com pessoas tão especiais, que tanto me auxiliaram. E ainda por ter me dado saúde e coragem para enfrentar todas as dificuldades encontradas ao longo do doutorado. Minha fonte de força para nunca desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogerio Tortelly pela amizade, carinho e incentivo despendidos durante este percurso e pelas contribuições para a realização desta tese.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela orientação, pelos ensinamentos e por todo o suporte oferecido para que este trabalho fosse concretizado.

Ao Fiscal Federal Leonardo Muliterno Domingues, ao Gerente Industrial Antônio Wanzuit, à Supervisora da Garantia da Qualidade Marisa Giasson, à Médica Veterinária Camila Reffati, a todos os agentes de inspeção do Frigorífico Aurora Chapecó e à Liana Lumi Ogino pela colaboração na obtenção dos dados e das amostras.

A todos os pesquisadores, analistas e assistentes do Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves (CNPSA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) que contribuíram para que esta pesquisa fosse executada. Agradeço em especial à Dra. Catia Silene Klein, Dr. Nelson Morés, Dra. Janice Reis Ciacci-Zanella, Dr. Arlei Coldebella, Neide Simon, Camila Sá Rocha, Kellen Ascoli, Franciele Ianiski, Marcos Morés, Raquel Rebelatto, Franciana Bevilacqua, Catiúscia Locatelli e Danielle Gava pelos momentos compartilhados e conhecimentos repassados. Foi muito bom conviver com vocês!

À Dona Laura, Sr. Tony e Dona Minda, pela grande consideração para comigo e por terem me acolhido de forma tão carinhosa enquanto estive em Concórdia.

Às minhas amigas em Niterói: Monique da Silva Neves, Carla da Silva Carneiro, Juliana Paulino Vieira, Marcele Trotte, Priscila Nogueira de Souza Ferreira, Emília Lima Nunes, Marjorie Toledo Duarte, Carla Soares Praxedes e Andrea Vazirani por terem sido grandes companheiras, me ajudando em todos os momentos que precisei.

Aos colegas de Pós-Graduação, pela convivência e troca de experiências ao longo de todos estes anos.

Em especial, agradeço à minha colega e querida amiga Fernanda Lima Cunha, por ter me acompanhado e colaborado em TODOS os momentos do doutorado. Foi através desta parceria tão bem sucedida que conseguimos fazer tanta coisa!

Aos amigos do CEIR, por terem sido minha segunda família enquanto estive em Niterói, tornando minha vida muito mais feliz e cheia de significado! Em especial, agradeço à Alzimar, ao Adir e ao Daniel. Que Deus os recompense por tudo!

À minha grande amiga Mirella Lopes da Rocha, ao amigo e colega Laerte Pereira de Almeida, ao Leonardo Gaze, às amigas Fernanda Martinez Xavier Alves e Patrícia Riddell Millar Goulart, pelo incentivo, pela torcida e pelas palavras de encorajamento sempre!

A todos os que colaboraram de forma direta e indireta; aos meus amigos que não foram anteriormente citados, tanto os de perto quanto os longe, que acreditaram e acreditam mim. Muito obrigada por tudo!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pelo apoio financeiro.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,  
perca com classe e vença com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito para ser insignificante.”

**Charles Chaplin**



## SUMÁRIO

**RESUMO**, p. 9

**ABSTRACT**, p. 10

**1 INTRODUÇÃO**, p. 11

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 13

2.1 A IMPORTÂNCIA DA SUINOCULTURA BRASILEIRA NOS CENÁRIOS NACIONAL E INTERNACIONAL, p. 13

2.2 PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA, p. 15

**2.2.1 Agente etiológico**, p. 15

**2.2.2 Mecanismos de patogenicidade do *M. hyopneumoniae***, p. 17

**2.2.3 Patogenia e alterações anatomopatológicas**, p. 18

**2.2.4 Diagnóstico da PES e do *M. hyopneumoniae***, p. 21

**2.2.5 Prejuízos econômicos**, p. 23

2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO PCV2, p. 24

**2.3.1 Agente etiológico**, p. 25

**2.3.2 Aspectos históricos, distribuição e prejuízos econômicos**, p. 27

**2.3.3 Patogenia, manifestações clínicas e alterações anatomopatológicas**, p. 30

**2.3.4 Diagnóstico do PCV2 e doenças associadas**, p. 35

**3 DESENVOLVIMENTO**, p. 37

3.1 DIAGNÓSTICO DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA PELA INSPEÇÃO SANITÁRIA *POST-MORTEM*: COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO. Enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis A2), p. 37

3.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*, CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E *Leptospira* spp. NA ETIOLOGIA DE NEFRITES EM SUÍNOS DE ABATE COM

OU SEM LESÕES DE PNEUMONIA ENZOÓTICA. Enviado para “Journal of Veterinary Diagnostic Investigation” (Qualis B1), p. 46

3.3 INFLUÊNCIA DO *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS DE ABATE COM LESÕES MICROSCÓPICAS PULMONARES E RENAIIS SOBRE O PESO, ESPESSURA DE GORDURA, RENDIMENTO E PERCENTUAL DE CARNE MAGRA. Enviado para Ciência Animal Brasileira (Qualis B2), p. 68

3.4. *Leptospira* spp. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA: POTENCIAL FONTE DE INFECÇÃO A TRABALHADORES DE MATADOURO FRIGORÍFICO. Aceito para publicação na Revista Brasileira de Medicina Veterinária (Qualis B1), p. 82

3.5 HISTOPATOLOGIA DE TONSILAS E LINFONODOS DE SUÍNOS DE ABATE: VERIFICAÇÃO DE LESÕES ASSOCIADAS AO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2. Enviado para “Acta Scientiae Veterinariae” (Qualis B1), p. 91

3.6 PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA: RELATIONSHIP BETWEEN MICROSCOPIC LUNG AND KIDNEY LESIONS IN SANTA CATARINA, BRAZIL. Publicado na Revista “Bioscience Journal” (Qualis B2), p.109

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**, p. 121

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 123

**6 APÊNDICE**, p.148

6.1 BIOSCIENCE JOURNAL, p. 149

## RESUMO

O *Mycoplasma hyopneumoniae*, associado à Pneumonia Enzoótica Suína (PES) e Circovirus Suíno Tipo 2 (PCV2) são dois patógenos causadores de significativas perdas econômicas para a indústria suinícola. Além de causar pneumonia, suspeita-se que o *M. hyopneumoniae* não seja exclusivo do trato respiratório, podendo estar presente em outros órgãos causando lesões, as quais podem ser confundidas com aquelas causadas pelo PCV2. Este trabalho objetivou diagnosticar a presença de *M. hyopneumoniae* em tecidos pulmonar e renal, de PCV2 em rins e tecido linfóide e de *Leptospira* spp. em tecido renal; identificar e caracterizar histologicamente as lesões presentes nestes órgãos, avaliar a concordância dos diagnósticos de PES na Inspeção *post-mortem* com outros métodos e verificar se as variáveis de desempenho são influenciados pela presença de lesões microscópicas pulmonares, renais e *M. hyopneumoniae*. Foram coletados tecidos pulmonares de 50 suínos com lesões macroscópicas de PES e de 50 suínos considerados normais, abatidos sob inspeção sanitária, além de fragmentos de rins, linfonodo e tonsila, bem como seus dados de desempenho. Parte dos fragmentos foram fixados em formol 10%, processados pelas técnicas habituais para inclusão em parafina, submetidos aos diagnósticos histopatológico e pela imunohistoquímica (IHQ). A outra parte foi congelada e submetida à Reação em Cadeia da Polimerase ("Nested-PCR"), para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* e PCV2. O *M. hyopneumoniae* foi detectado em 96,87% dos rins com lesões microscópicas, comprovando que este agente pode ser detectado em tecido renal de suínos com lesão. Não foi detectada a presença de *Leptospira* spp. em tecido renal. Houve concordância entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária *post-mortem* com a histopatologia e com a IHQ e da histopatologia com a IHQ, permitindo concluir que o diagnóstico conferido pelos funcionários da Inspeção Sanitária nos matadouros não está equivocado, sendo a macroscopia um método válido para o diagnóstico de PES, porém este não confere a detecção de *M. hyopneumoniae*. As lesões microscópicas pulmonares influenciaram a espessura de gordura e o percentual de carne magra, porém não influenciaram o peso; as lesões microscópicas renais e a presença de *M. hyopneumoniae* pela IHQ não influenciaram as variáveis de desempenho, possivelmente pelo fato dos animais analisados terem sido vacinados contra este agente etiológico. Foi detectado o DNA de PCV2 em 76% dos linfonodos e em 67% das tonsilas. No entanto, quando presentes, as lesões detectadas nestes órgãos foram brandas. Este quadro reflete a mudança no cenário de saúde de suínos com relação ao PCV2 após a adoção de vacinação dos rebanhos, de forma que a manifestação clínica da enfermidade atualmente é rara.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*. PCV2. Nested-PCR. Pneumonia Enzoótica Suína. *Leptospira* spp. Suínos. Histopatologia. Inspeção sanitária.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae*, associated with Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) are two pathogens that cause significant economic losses to the pig industry. In addition to causing pneumonia, it is suspected that *M. hyopneumoniae* is not exclusive of the respiratory tract and may be present in other organs, causing lesions, which can be confused with those caused by PCV2. This study aimed to diagnostic the *M. hyopneumoniae* in lung and kidney tissues, the presence of PCV2 in kidneys and lymphoid tissue and *Leptospira* spp. in renal tissue; to identify and describe histological lesions present in these organs, to compare the reliability of diagnosis of PEP in the *post-mortem* inspection with other methods and verify the performance variables are influenced by microscopic lung lesions, renal and *M. hyopneumoniae*. Lung tissues were collected from 50 pigs with macroscopic lesions PEP and 50 considered normal pigs, slaughtered under sanitary inspection, and fragments of kidney, lymph node and tonsil, as well as their performance data. Part of the fragments were fixed in 10% formalin, processed by standard techniques for paraffin, subjected to histopathologic diagnostic and by immunohistochemistry (IHC). The other half was frozen and subjected to Polymerase Chain Reaction ("nested PCR"), for the diagnosis of *M. hyopneumoniae* and PCV2. *M. hyopneumoniae* was detected in 96.87% of kidneys with microscopic lesions, confirming that this agent can be detected in kidney tissue of pigs with and without injury. It was not detect the presence of *Leptospira* spp. in renal tissue. There was agreement between the diagnosis of Sanitary Inspection *post-mortem* with the histopathology and IHC and the histopathology with IHC, allowing this to conclude that the diagnosis given by the staff of Sanitary Inspection in slaughterhouses is not wrong, and the macroscopic a valid method for the diagnosis of PEP, understanding if this is not to say that the detection of *M. hyopneumoniae*. The microscopic lung lesions influenced the fat thickness and percentage of lean meat, but did not affect weight, microscopic renal lesions and the presence of *M. hyopneumoniae* by IHC did not influence the performance variables, possibly because of the analyzed animals have been vaccinated against this agent. Was detected PCV2 DNA in 76% of lymph nodes and in 67% of the tonsils. However, when present, the lesions were detected in these soft organs. This table reflects the change in scenery health of pigs with PCV2 compared to after the adoption of vaccination of cattle, so that the clinical manifestation of the disease is now rare.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2, Nested-PCR, Porcine Enzootic Pneumonia, *Leptospira* spp., swine, histopathology, sanitary inspection.

## 1 INTRODUÇÃO

Os dois patógenos mais prevalentes na suinocultura tecnificada atual são o *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2), que causam perdas econômicas significativas, tanto para os produtores quanto para a indústria (EGGEN et al., 2010). O primeiro deles está relacionado à Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma enfermidade respiratória crônica. Interagindo com outros patógenos secundários, ocasiona redução na taxa de crescimento, piora na taxa de conversão alimentar, aumento nos custos de medicação, aumento nos índices de mortalidade e depreciação de carcaças no frigorífico, devido à aderência de pleura e abscessos pulmonares (MAES, 2010; MAES et al., 1996).

Apesar dos esforços e estratégias de controle adotados, o *M. hyopneumoniae* continua a ser um organismo amplamente difundido nas populações de suínos, o que torna a erradicação da doença ocasionada pelo mesmo, uma tarefa muito difícil e frustrante (VILLAREAL, 2011). Além do quadro de pneumonia já bem estabelecido, suspeita-se que este agente não seja exclusivo e específico do trato respiratório, podendo estar presente em outros órgãos causando lesões. Deve ser, portanto, investigada a sua presença em outros órgãos.

O segundo agente citado é considerado um patógeno emergente, o qual está associado a diferentes síndromes e enfermidades. Baseado em estudos sorológicos, presume-se que infecção por PCV2 é onipresente em todo o mundo e de forma geral, todos os animais em condições de campo estão infectados por este agente (RAMAMOORTHY e MENG, 2008; SEGALÉS et al., 2005).

Quando há manifestação clínica, dependendo da síndrome, os animais podem apresentar emagrecimento progressivo e diversos órgãos podem ser acometidos, resultando em pneumonias, hepatites e nefrites (ALLAN e ELLIS, 2000).

Muitas vezes, as lesões que este agente ocasiona, podem ser confundidas com lesões desencadeadas por outros agentes etiológicos, incluindo o *M. hyopneumoniae*. No entanto, com a disponibilização de vacinas comerciais e a adoção da prática de vacinação dos rebanhos em massa como medida de controle das enfermidades desencadeadas por este agente, a principal forma de manifestação é a subclínica (YOUNG et al., 2011). Embora os animais não manifestem sinais clínicos, o comprometimento produtivo ainda permanece, ocasionando diminuição de parâmetros produtivos (ganho médio diário, condição corporal e peso da carcaça), além da ocorrência de lesões discretas em órgãos linfóides, sobretudo linfonodos (SIMÃO, 2010).

As lesões histopatológicas atribuídas ao PCV2 são observadas em diversos órgãos, mas predominantemente nos órgãos linfóides. Também se observa frequentemente, lesões como hepatites, pneumonia intersticial e nefrites nos animais infectados (ROSSEL et al., 1999). Dessa forma, faz-se necessário diferenciar qual é o agente etiológico envolvido no desencadeamento das lesões renais, incluindo a *Leptospira* spp., importante patógeno que pode ocasionar as referidas lesões.

Nesta pesquisa objetivou-se diagnosticar a presença de *M. hyopneumoniae* em tecidos pulmonar e renal e de PCV2 em rins e tecido linfóide (linfonodos e tonsilas), identificar e caracterizar histologicamente as lesões presentes nestes órgãos, avaliar a concordância dos diagnósticos de pulmões com lesões sugestivas de PES na Inspeção *post-mortem* com outros métodos de diagnóstico (histopatologia e Imunohistoquímica) e verificar se as variáveis de desempenho (peso, espessura de gordura, rendimento e porcentagem de carne magra) são influenciados pela presença de lesões microscópicas pulmonares, lesões microscópicas renais e *M. hyopneumoniae*. Busca-se dessa forma comprovar a hipótese de que o *M. hyopneumoniae* pode estar presente no tecido renal de suínos de terminação abatidos sob inspeção sanitária e se o diagnóstico conferido pelos funcionários da Inspeção Sanitária nos matadouros não está equivocado.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A IMPORTÂNCIA DA SUINOCULTURA BRASILEIRA NOS CENÁRIOS NACIONAL E INTERNACIONAL**

A suinocultura brasileira, cujo objetivo principal culmina com a obtenção de carne suína, é uma atividade organizada, presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais existentes no país. Utilizando mão-de-obra tipicamente familiar, é praticada na maioria por pequenos produtores que participam de sistemas integrados coordenados pelas agroindústrias, tendo importância fundamental na fixação do homem no campo por meio da geração de empregos tanto diretos quanto indiretos (BOHRER, 1993; YAMAGUTI, 2009).

Apesar de a carne suína ser a mais consumida no mundo, com cerca de 39% do consumo total de carnes, a produção brasileira, participa no comércio internacional, anualmente, com menos de cinco milhões de toneladas, em equivalente carcaça, sendo ultrapassada em volume pelas carnes de aves e bovinos (ABIPECS, 2012; SAAB e CLÁUDIO, 2010).

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Carne Suína (ABIPECS) a China é hoje o país com a maior produção de carne suína, detendo praticamente metade da produção mundial, porém os maiores exportadores são os Estados Unidos e a União Européia (ABIPECS, 2012). Estudos e investimentos na suinocultura posicionaram o Brasil em quarto lugar no “ranking” de produção e exportação mundial de carne suína. Alguns elementos como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores, contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário mundial. Especialistas brasileiros

também investiram na evolução genética da espécie por 20 anos, o que reduziu em 31% a gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa (BRASIL, 2012).

Consequência de investimento, a produção vem crescendo em torno de 4,9% ao ano sendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul os principais estados produtores de suínos do país (ABIPECS, 2012).

Atualmente, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, e no ano de 2011 a receita gerada com as exportações foi de US\$ 130,61 milhões (ABCS, 2012). Devido ao fechamento do mercado russo em meados de 2011, a disponibilidade de carne suína no mercado brasileiro aumentou em 6,7% em relação a 2010, o equivalente a 180 mil toneladas, fato que favoreceu o aumento do consumo interno desta carne no Brasil. Este consumo interno brasileiro teve um incremento em torno de 5%, fazendo com que o consumo per capita (Kg) passasse de 14,33 Kg em 2010 para 15,06 Kg em 2011 (ABIPECS, 2012).

Os principais países que importaram a carne suína brasileira no ano de 2011 foram a Rússia, Hong Kong, Ucrânia, Cingapura e Argentina (ABIPECS, 2012). Contudo, outros mercados em potencial poderiam receber os produtos brasileiros, mas existem várias barreiras à comercialização da carne suína. Dentre as principais restrições à exportação pelo Brasil, estão os problemas sanitários nos rebanhos, ocasionados principalmente por doenças multifatoriais, incluindo as respiratórias e entéricas, as quais comprometem o sistema imune dos suínos e ocasionam muitas perdas econômicas (COSTA, 2002; SAAB e CLÁUDIO, 2010).

A forma de produção de suínos passou por diversas mudanças para atender às necessidades de mercado, com a alteração no modelo de criação extensiva para intensiva, que resultou na exacerbação de doenças multifatoriais, uma vez que sua frequência e grau de severidade dependem não somente das características do(s) agente(s) e da imunidade do rebanho, mas também das condições ambientais em que os animais são criados (SOBESTIANSKY et al., 1987). Dentre as enfermidades multifatoriais, a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) e as Doenças Associadas ao Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2) acarretam perdas econômicas significativas na suinocultura tecnificada, devido à frequência e intensidade com que atingem os rebanhos (CHRISTENSEN et al., 1999; RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2003). A seguir serão abordados aspectos relativos a estas duas enfermidades.



## 2.2 PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença infecciosa crônica, altamente contagiosa, de distribuição cosmopolita, caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, cujo agente etiológico principal envolvido é o *Mycoplasma hyopneumoniae* (COSTA, 2002; OBOEGBULEN, 1981). Este foi isolado pela primeira vez em 1965, sendo demonstrada também neste mesmo ano, a capacidade deste agente em causar enfermidade (GOODWIN et al., 1965; MARÉ e SWITZER, 1965).

Em nível de campo, após este patógeno aderir e posteriormente causar danos ao epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos, predispõe a instalação de patógenos secundários, ocasionando complicações broncopulmonares purulentas, que se manifestam clinicamente por tosse seca e atraso no crescimento (HAESEBROUCK et al., 2004; THACKER et al., 1999a).

Suínos de todas as idades são geralmente afetados, porém a forma clínica da doença é mais comum nos animais nas fases de crescimento e terminação. A transmissão ocorre por contato direto, indireto e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse. Sua ocorrência e severidade são influenciadas por variáveis ambientais e de manejo, sendo considerada uma doença multifatorial. As perdas econômicas em função da PES são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a taxa de conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Devido à diminuição da taxa de crescimento, piora na conversão alimentar, aumento dos custos de tratamento e aumento da mortalidade caso não seja controlada, é uma enfermidade que recebe muita atenção da comunidade científica (GEORGAKIS et al., 2002; MAES et al., 2008; RAUTIAINEN et al., 2000; ROSS, 1999;).

### 2.2.1 Agente Etiológico

Os micoplasmas pertencem à classe *Mollicutes* (*mollis*, mole; *cutis*, pele, em latim), sendo, portanto diferenciados fenotipicamente de outras bactérias, pelo

diminuto tamanho e ausência de parede celular. São reconhecidos como os menores microrganismos (0,2 µm) capazes de se autoreplicar (BLANCHARD et al., 1992; JACQUES et al., 1992; TAJIMA e YAGIHASHI, 1982). Esta classe é composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasmata*, *Asterosplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma* (WALKER, 2003).

Sua morfologia é bastante variada, em função da ausência de parede celular, podendo a célula apresentar-se em forma de pênula, esférica, espiral ou filamentosa. É corada insatisfatoriamente pelo Método de Gram, sendo recomendadas as colorações de Giemsa, Castañeda, Dienes e Novo Azul de Metileno. Possuem membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, sendo este responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (WALKER, 2003). A ausência de parede celular torna os micoplasmas resistentes aos antimicrobianos que afetam a sua síntese, como penicilinas, cefalosporinas e bacitracinas, sendo estes, portanto, ineficazes para tratamento (SOBESTIANSKY et al., 1999). Além disso, necessitam que haja um contato íntimo com as células do hospedeiro, para que seja capaz de suprir as necessidades nutricionais indispensáveis para a sua sobrevivência (CLARK, 2005).

O *M. hyopneumoniae* possui um genoma simples e pequeno (893-920 quilo-pares de bases) (MINION et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005). Infecta uma única espécie, a suína, porém os mecanismos de especificidade do hospedeiro ainda são desconhecidos (CONCEIÇÃO e DELLAGOSTIN, 2006). É extremamente sensível às condições ambientais, não sendo capaz de sobreviver durante longo período fora de seu hospedeiro, mas em aerossóis seu tempo de sobrevivência aumenta, podendo permanecer em sua forma infecciosa por até 31 dias em água a 2-7°C (GOODWIN, 1972). É um microrganismo de vida livre, ao contrário de micoplasmas patogênicos ao homem (*M. genitalium* e *M. pneumoniae*), que são intracelulares, sendo difícil seu isolamento e cultivo em função de sua natureza singular (ROSS, 1999).

*In vitro* este microrganismo é caracterizado por um crescimento lento e fastidioso, sendo extremamente difícil de ser isolado (FRIIS, 1974). Em função deste comportamento, o isolamento não é utilizado para o diagnóstico de rotina (THACKER, 2004). Este crescimento lento e fastidioso está relacionado à sua

dependência em relação ao fornecimento de determinados nutrientes e condições ambientais constantes. Assim, uma série de aminoácidos essenciais e ácidos graxos são requeridos no meio de cultura, uma vez que uma proporção considerável de genes envolvidos na biossíntese de cofatores foram perdidos ao longo de sua evolução (POLLACK, 2002; RAZIN et al., 1998).

### **2.2.2 Mecanismos de patogenicidade do *M. hyopneumoniae***

O *M. hyopneumoniae* possui a capacidade de alterar ou desviar a resposta imune e pré dispor o suíno a infecções secundárias (CIPRIAN et al., 1988; DEBEY e ROSS, 1994; THACKER et al., 1999a). Segundo Conceição e Dellagostin (2006), uma característica muito importante de micoplasmas com potencial patogênico, é a notável capacidade de alterar os seus antígenos de superfície. Por meio deste mecanismo, estes microrganismos conseguem evadir a resposta imune montada pelo hospedeiro e estabelecer uma infecção crônica (ASAI et al., 1996.; HENDERSON et al., 1996; MUNETA et al., 2006; MUNETA et al., 2008). Estudos tem demonstrado que este agente permanece nos pulmões por até 6 (FANO et al., 2005) ou 8 meses (PIETERS et al., 2009) após o desafio.

A variação antigênica em micoplasmas geralmente está relacionada à presença de sequências de DNA repetitivas nos genes. Provavelmente, durante o processo de replicação do DNA é que ocorre a mudança no número de unidades repetitivas responsável pela variação antigênica (DJORDJEVIC et al., 2004). No entanto, ao contrário de outros micoplasmas, o *M. hyopneumoniae* contém poucos genes com sequências repetitivas que poderiam estar envolvidas na variação antigênica (MINION et al., 2004). Desta forma, não está claro como este microrganismo evade o sistema imune e estabelece uma infecção crônica.

Outros mecanismos de patogenicidade que os micoplasmas patogênicos utilizam, além da evasão e/ou modulação da resposta imune do hospedeiro, envolve a adesão/colonização, citotoxicidade, competição por substratos, efeito clastrogênico e oncogênico (RAZIN et al., 1998; ROSS, 1999). Razin et al. (1998) sugerem também que os danos causados em humanos e animais devido às infecções causadas por micoplasmas, deve-se à resposta imune e inflamatória instalada e não ao efeito tóxico direto causado pelos componentes destes microrganismos.

Algumas espécies de micoplasma (como por exemplo, o *M. gallisepticum*) tem a capacidade de penetrar e se estabelecer dentro de células hospedeiras (WINNER et al., 2000), mas não há nenhuma evidência que isto ocorra com o *M. hyopneumoniae* (JENKINS et al., 2006). Com relação a outras espécies, como por exemplo, o *M. mycoides*, alguns autores tem sugerido que a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pode estar envolvida no dano às células hospedeiras (MILES et al., 1991; RICE et al., 2001). Mas não se sabe se este é também o caso do *M. hyopneumoniae* (VILLARREAL, 2010).

Outros micoplasmas podem ser vistos aderidos intimamente às células do trato urogenital e articulações nos animais e no ser humano. Esta aderência pode ser íntima a ponto de promover trocas antigênicas ou mesmo a fusão celular (BLANCHARD e BROWNING, 2005).

Caruso e Ross (1990) demonstraram que a fagocitose pelos macrófagos alveolares é suprimida durante a infecção pelo *M. hyopneumoniae*. Além disso, Asai et al. (1996) demonstraram por quimioluminescência que os neutrófilos obtidos a partir do lavado brônquio-alveolar em suínos infectados experimentalmente com *M. hyopneumoniae* foi suprimida, indicando uma diminuição na função destas células. Thanawongnuwech et al. (2004) também constatou a capacidade deste agente em inibir a função dos neutrófilos, o que contribuiria para infecções secundárias no organismo do animal.

Os mecanismos envolvidos na patogenicidade deste agente permanecem obscuros (VILLARREAL, 2010). Suas propriedades biológicas, a capacidade de provocar alterações nas células, bem como as características singulares de parasitismo e interação, evidenciam a complexidade deste microrganismo como patógeno, desafiando de modo diferenciado, a homeostasia do hospedeiro.

### **2.2.3 Patogenia e alterações anatomopatológicas**

Após ser inalado, o *M. hyopneumoniae* adere e coloniza o epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos, formando microcolônias nas pontas e ao longo do comprimento dos cílios, causando esfoliação dos mesmos num segundo momento (BLANCHARD et al., 1992;. KWON et al., 2002; SARADELL et al., 2003). A adesão é um pré-requisito para iniciar a doença (TAJIMA e YAGIHASHI, 1982), cujo

processo é mediado por carboidratos e proteínas (LI et al., 2009; ZIELINSKI et al., 1993) presentes na superfície deste microrganismo e no epitélio do trato respiratório suíno. São capazes ainda de alterar a motilidade dos cílios ou mesmo provocar efeitos que levam à degeneração destas estruturas (ROSS, 1999). As células epiteliais ciliadas da traqueia, brônquios e bronquíolos, a secreção de muco e os macrófagos alveolares são importantes para a remoção de partículas nocivas e agentes patogênicos inalados. Uma vez que a atividade ciliar é prejudicada, este sistema de depuração torna-se ineficaz, levando à hipersecreção excessiva de glicoproteína pelas células caliciformes (DEBEY et al., 1992). Assim, a perda na eficiência do sistema mucociliar, importante mecanismo de defesa inespecífico, e o aumento da produção de muco oportunizam infecções secundárias (CIPRIAN et al., 1988; JACQUES et al., 1992; SORENSEN et al., 1997).

O *M. hyopneumoniae* interage com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial (RODRÍGUEZ et al., 2004), características da PES, sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões. Além disso, são capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T (MESSIER e ROSS, 1991; RAZIN et al., 1998), o que também poderia auxiliar na evolução da hiperplasia linfóide. O avanço da hiperplasia resulta na obstrução das vias aéreas, levando à formação das lesões atelectásicas nos pulmões, os quais apresentam aspecto de consolidação e coloração que varia do vermelho escuro tendendo ao roxo nos casos agudos (ARMSTRONG, 1994; THACKER et al., 1999b, VAN ALSTINE et al., 1996) a castanho acinzentado nos casos crônicos (THACKER et al., 1999a), localizadas principalmente na região cranioventral dos lobos apicais e cardíaco (SOBESTIANSKY et al., 1999). As lesões resolvidas aparecem como áreas colapsadas de consolidação, fissuradas e levemente necróticas, resultando em segmentação dos lobos (NOGUEIRA, 1996).

As lesões se resolvem com o tempo (ANDREASEN et al., 2001). Dessa forma, as lesões encontradas na inspeção *post-mortem* podem apresentar diferenças, em consequência do tempo decorrido entre a infecção e o abate. Sobestiansky et al. (2001) demonstraram o que pode acontecer quando a infecção ocorre na fase de creche, recria e fase inicial de terminação em relação à presença de lesões pulmonares detectáveis em matadouros. Caso a infecção ocorra na

creche, os sinais clínicos serão manifestados na fase de recria e início de terminação. Como as lesões tendem a cicatrizar entre 30 a 70 dias após o início da manifestação dos sinais, pode-se observar que no período em que os animais forem abatidos, a maioria das lesões já estará cicatrizada e dessa forma poderão ser consideradas “sem lesão” no abate. Por outro lado, quando a infecção ocorre no início da recria, observa-se que os sinais ocorrem em geral na fase inicial da terminação. Quanto às lesões, nesse caso, apenas parte dos leitões estará positiva por ocasião do abate. Dentro dessa lógica, apenas as infecções na fase de terminação apresentarão no abate lesões plenamente identificáveis.

Histologicamente a PES apresenta o padrão morfológico de pneumonia catarral broncointersticial, com formação de extensa hiperplasia de tecido linfóide peribronquial, peribronquiolar e perivascular. Nos casos crônicos, podem ser observados nódulos linfóides, às vezes com esboços de centros germinativos ou mesmo ocorrência de fibrose peribronquial e peribronquiolar, provocando destruição da *muscularis mucosae* e causando estreitamento do lúmen dos brônquios e bronquíolos (ROSS et al., 1992).

Embora alguns estudos de microscopia eletrônica, relacionando a interação entre *M. hyopneumoniae* e o epitélio respiratório suíno (BLANCHARD et al., 1992; TAJIMA e YAGIHASHI, 1982) não evidenciaram que este patógeno seja capaz de atravessar a barreira de células epiteliais, em outros estudos, o *M. hyopneumoniae* foi isolado do fluido pericárdico (BUTTENSCHON et al., 1997) e cérebro (FRIIS, 1974) de suínos criados comercialmente, bem como de linfonodos, baço, fígado e rins de animais infectados experimentalmente por via intratraqueal (LE CARROU et al., 2006; MAROIS et al., 2007). Tais autores sugerem que a disseminação deste patógeno pelos órgãos internos ocorre por via linfática (devido à recuperação deste microrganismo a partir de linfonodos) ou por via hemática. Estas observações sugerem que o *M. hyopneumoniae* possui a capacidade de colonizar diferentes tecidos suínos (WILTON et al., 2009), porém os autores destes estudos não explicitam qual seria o mecanismo utilizado por este agente para esta colonização extra pulmonar.

#### 2.2.4 Diagnóstico da PES e do *M. hyopneumoniae*

Em virtude das características da PES, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela conjunção dos sinais clínicos (tosse crônica não produtiva, redução do crescimento, baixa mortalidade e desuniformidade dos lotes) e dos aspectos macroscópicos (áreas de consolidação de cor púrpura a cinza) e microscópicos das lesões (hiperplasia linfóide peribronquiolar) (AHRENS e FRIIS, 1991; DONE, 1996; ROSS e STEMKE, 1995).

A verificação de lesões pulmonares na inspeção *post-mortem* de suínos no abate (HURNIK et al., 1992; MORRIS et al., 1995; SIBILA et al., 2009) é frequentemente adotada para investigar o envolvimento de *M. hyopneumoniae* em doenças respiratórias nos rebanhos. Sistemas de avaliação por escore baseados em lesões macroscópicas pulmonares tem sido descritos por diversos autores (HANNAN et al., 1982; HURNIK et al., 1993; LIUM e FALK 1991; MORRISON et al., 1985; OSTANELLO et al., 2007). Todavia, esse procedimento possui uma parcela de subjetividade e imprecisão, pelo fato de que outros agentes podem causar sinais clínicos e lesões parecidas (SIBILA et al., 2008). Além deste fato, devido às infecções secundárias que geralmente ocorrem, tanto os sinais clínicos quanto as lesões podem apresentar alterações na sua forma de apresentação. Para a confirmação do diagnóstico do agente etiológico, faz-se necessária a utilização de recursos laboratoriais complementares, a fim de se evitar o diagnóstico inconclusivo e controverso (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Embora o isolamento a partir de pulmões infectados através de técnicas bacteriológicas seja considerado o padrão ouro (“Gold Standard”) das técnicas de diagnóstico para o *M. hyopneumoniae*, tal metodologia raramente é utilizada, pois apresenta muitas limitações, como crescimento lento, interferência com outros micoplasmas de suínos presentes no material biológico, meio de cultivo diferenciado e profissional especializado (OLIVEIRA, 2008; RAZIN, 2002; SIBILA et al., 2009; YAMAGUTI, 2003).

A detecção precisa do *M. hyopneumoniae* aumentou significativamente com os avanços da biologia molecular, métodos baseados na aplicação de tecnologia do DNA recombinante, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ABIVEN et al., 1992; AHRENS e FRIIS, 1991; FUTO et al., 1992; STEMKE, 1989). O primeiro teste

para amplificar e detectar especificamente o DNA deste microrganismo foi descrito por Harasawa et al. (1991). Desde então vários testes tem sido relatados (CALSAMIGLIA et al., 1999; CARON et al., 2000; KURTH et al., 2002; MATTSON et al., 1995; STÄRK et al., 1998; STRAIT et al., 2008; THACKER et al., 2004; VERDIN et al., 2000).

A PCR possibilita a detecção do *M. hyopneumoniae* a partir de amostras biológicas como lavado traqueal, suabes nasais e fragmentos de pulmão (BAUMEISTER et al., 1998; BLANCHARD et al., 1996; CALSAMIGLIA et al., 1999; STEMKE, 1997; VERDIN et al., 2000). Estes trabalhos permitiram constatar a alta sensibilidade e especificidade da técnica, possibilitando que a identificação do agente fosse mais rápida e mais precisa (BACCARO et al., 1999; MATTINSON et al., 1995; VERDIN et al., 2000).

Uma variação da PCR convencional é a “Nested-PCR” (N-PCR), que consiste em uma segunda amplificação do produto obtido na primeira etapa, aumentando o limiar de detecção da PCR convencional de um único passo (CALSAMIGLIA et al., 2000; STARK et al., 1998, VERDIN et al., 2000). São utilizados “primers” internos específicos, os quais reconhecem a sequência de nucleotídeos da primeira amplificação (BLANCHARD et al., 1996). A segunda amplificação além de aumentar a sensibilidade da primeira etapa também confirma a especificidade do produto da primeira reação (TANG et al., 1997).

A N-PCR é suficientemente sensível para detectar 1-4 microrganismos/ $\mu$ l da amostra de PCR (GEBRUERS et al., 2008; KURTH et al., 2002). Verdin et al. (2000) e Yamaguti et al. (2008) utilizaram a N-PCR e encontraram sensibilidade de um fentograma (equivalente a um microrganismo) e 80 fentogramas, respectivamente, demonstrando a eficiência desta técnica. No entanto, há maior risco de contaminação devido aos procedimentos de pipetagem repetidas. Para evitar resultados falsos positivos devido à contaminação, controles positivos e negativos devem ser usados durante a extração do DNA e sua amplificação (VILLAREAL, 2010). O tecido pulmonar e o lavado traqueal são considerados os locais de coleta mais confiáveis para a detecção do *M. hyopneumoniae* (KURTH et al., 2002).

A detecção deste microrganismo no tecido pulmonar também pode ser realizada por meio de métodos de imunohistoquímica (IHQ). Segundo Gimeno (1995), estes são baseados na conjugação de distintos marcadores com moléculas de imunoglobulinas. Constitui-se num método complementar a histopatologia, no



qual a marcação de anticorpos com diversas enzimas ou compostos fluorescentes permite localizar determinantes antigênicos nas intimidades das células e tecidos fixados e processados por métodos histológicos convencionais. Em todos os métodos imunoenzimáticos utiliza-se uma reação enzima-substrato que transforma o cromógeno incolor em um produto final colorido.

A IHQ pode ser realizada com tecidos fixados em parafina, tornando esta técnica mais prática. Ribeiro et al. (2004) apontaram esta técnica como uma boa ferramenta auxiliar, rápida e de baixo custo para a detecção de *M. hyopneumoniae* em laboratórios de rotina em histopatologia. Anticorpos monoclonais são comumente utilizados para detectar os antígenos de *M. hyopneumoniae*, tornando-os específicos. No entanto, se as vias aéreas contendo epitélio ciliado não forem incluídas nas amostras de tecido coletadas para o diagnóstico, nenhum organismo será detectado, levando a resultados falsos negativos (THACKER, 2004).

O diagnóstico eficiente da enfermidade induzida por *M. hyopneumoniae* pode ser complicado e frustrante. A presença deste organismo sozinho nem sempre é correlacionado à doença e pneumonia. Entretanto, se a doença respiratória estiver presente em rebanhos positivos para o *M. hyopneumoniae*, provavelmente o microrganismo esteja contribuindo para a manifestação clínica e lesões de pneumonia (THACKER, 2004).

### **2.2.5 Prejuízos Econômicos**

Alguns autores apontam que o *M. hyopneumoniae* é predominante em todo o mundo onde a suinocultura é desenvolvida, com uma prevalência aproximando-se de 100% nos rebanhos (FLECK e SNELSON, 2004). Na maioria das granjas em que os animais apresentam sinais de problemas respiratórios, 20-80% dos suínos na ocasião do abate exibem lesões de pneumonia associadas com a infecção por este agente (JIRAWATTANAPONG et al., 2010; LENEVEU et al., 2005; MORRIS et al., 1995; SIBILA et al., 2007).

Os prejuízos econômicos em decorrência da infecção e complicação ocasionados por este microrganismo são considerados como uma das mais importantes na cadeia de produção suinícola (RAUTIAINEN e WALLGREN, 2001). O aspecto econômico mais relevante nestes casos refere-se à redução do

desempenho do suíno, traduzido em menor ganho de peso e pior conversão alimentar. Straw et al. (1999) realizaram uma análise de 27 estudos sobre o impacto econômico do *M. hyopneumoniae* e concluíram que, em média, a PES causa uma redução de 17% no ganho de peso diário. Os mesmos autores também deduziram que em média, para cada 10% do pulmão lesionado, o ganho de peso diário é reduzido em 37 gramas.

A maioria dos dados sobre perdas econômicas está baseada na avaliação de pulmões no abate. No entanto alguns autores não encontraram correlação entre ganho de peso diário médio e a severidade das lesões observadas na PES. Noyes et al. (1990) relataram que lesões pneumônicas detectadas no abate não tinham correlação com lesões encontradas por meio de radiografias quando os animais estavam vivos. Estes autores puderam constatar, dessa forma, que o impacto econômico causado pela PES, sem dúvida, está altamente associado com outros fatores, tais como manejo deficiente, infecções bacterianas secundárias, alta densidade populacional e uso de sistemas contínuos de produção (não realização de vazio sanitário).

Quando o *M. hyopneumoniae* atua como agente predisponente e ocorre uma infecção secundária por outros agentes, as conseqüências se agravam, uma vez que, além do desempenho prejudicado, deve-se levar em consideração a morte dos animais por pneumonias, as despesas com medicamentos e em nível de indústria, a depreciação e até mesmo condenação de carcaças em função de alterações de pulmão e pleura e formação de abscessos pulmonares (SOBESTIANSKY et al., 2001).

### 2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO PCV2

Doenças associadas ao PCV2 é a denominação dada ao conjunto de manifestações causadas por este vírus que está disseminado em rebanhos suínos de todo o mundo. Atualmente, seu agente etiológico é considerado endêmico no Brasil, sendo que sua primeira manifestação clínica no país, por meio da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) foi descrita pela primeira vez em 2000. No entanto, o PCV2 foi diagnosticado em materiais de arquivo de 1988, sugerindo que a infecção já estava presente anteriormente no Brasil. Os fatores que

determinaram o surgimento desta enfermidade como uma doença emergente, nos últimos anos, permanecem desconhecidos (CIACCI-ZANELLA, 2007).

O PCV2 tem sido associado a um grande número de síndromes que afetam os suínos. Todas estas condições clínicas foram inicialmente referenciadas com os termos Circovirose (ROSELL et al., 2000a) e Doenças do Circovírus Suíno – “Porcine Circovirus Diseases” (PCVD) (ALLAN et al., 2002; SEGALÉS et al., 2005). Este último termo foi largamente usado na Europa, mas em 2006, na América do Norte, surgiu um novo termo, incluindo a palavra “associadas”, o qual ficou denominado Doenças associadas ao Circovírus tipo 2 – “Porcine Circovirus-Associated Disease (PCVAD)” (OPRIESSNIG et al., 2007). Trata-se, portanto, de uma enfermidade global, com a mesma etiologia e patogenia, porém com terminologias diferentes (SEGALÉS, 2012). Na presente revisão, será adotada a terminologia “Doenças associadas ao Circovírus Suíno” (PCVAD), tanto para designar todas as condições clínicas descritas na literatura, quanto à infecção subclínica pelo PCV2. Estas condições clínicas incluem o emagrecimento, aumento da mortalidade, sinais respiratórios, enterite, falha reprodutiva e a Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS) (BEACH e MENG, 2012).

### **2.3.1 Agente Etiológico**

O Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) foi descoberto e sequenciado em 1998, e desde a sua descoberta inicial até os dias atuais tem recebido grande atenção da comunidade científica, em grande parte devido à sua crescente associação com diferentes manifestações clínicas em suínos, tratando-se de um dos patógenos mais importantes economicamente na suinocultura tecnificada em nível mundial (MENG, 2012).

Os vírus incluídos na família *Circoviridae* caracterizam-se por serem não envelopados, pequenos, icosaédricos e infectam vertebrados (McNULTY et al., 2000; TODD et al., 2005). São encontrados com frequência em várias espécies, mas os suínos se constituem nos únicos mamíferos nos quais o vírus já foi isolado (CIACCI-ZANELLA, 2007). Seu genoma é composto por uma cadeia circular simples de DNA (TISCHER et al., 1974; TISCHER et al., 1982), com 1759 a 2319 pares de

bases (pb), unida de forma covalente em suas extremidades, conferindo um aspecto circular (MANKERTZ et al., 2004).

Os circovírus são extremamente estáveis sob condições ambientais. Cultivos celulares contendo estes vírus conservam seu potencial infectivo após a incubação a 56 ou 70°C e tratamento a pH 3 ou clorofórmio, por 15 minutos (FENAUX et al., 2004; HAMEL et al., 1998; MEEHAN et al., 1997; TISCHER et al., 1982). Essa resistência à inativação desempenha um importante papel na epidemiologia do agente e possui implicações para o controle das infecções por esses vírus (CIACCI-ZANELLA, 2007).

Dois circovírus já foram identificados em suínos: o PCV1 e o PCV2. O PCV1 foi descoberto em 1974 como um contaminante comum de células de cultivo de rim de suíno (PK-15) (TISCHER et al., 1974; TISCHER et al., 1982) e embora esteja presente na população de suínos de todo o mundo (ALLAN et al., 1994; TISCHER et al., 1986) não provoca manifestação clínica nos animais (TISCHER et al., 1995). Uma cepa variante, o PCV2 tem sido associado com diferentes síndromes clínicas, dentre elas a SMDS, uma doença emergente e multifatorial em suínos. Esta foi reconhecida pela primeira vez na América do Norte em 1991 (CLARK, 1997; HARDING, 1996). Desde então, esta forma de manifestação devastou quase todas as áreas de produção de suínos no mundo (FINSTERBUSCH e MANKERTZ, 2009).

O PCV1 e o PCV2 tem organização genômica semelhante e apresentam 76% de homologia (FINSTERBUSCH e MANKERTZ, 2009). Seus genomas possuem seis fases abertas de leitura ('ORFS') potenciais, mas apenas três codificam proteínas já identificadas: ORF1, ORF2 E ORF3. A ORF1 codifica uma proteína essencial para a replicação viral (CHEUNG, 2003; MANKERTZ et al., 2003). A ORF2 codifica a proteína do capsídeo viral, a qual tem a capacidade de se ligar ao receptor da célula hospedeira (KHAYAT et al., 2011; LEKCHAROENSUK et al., 2004; MISINZO et al., 2006; SHANG et al., 2009) e a ORF3 codifica uma proteína viral não essencial para a replicação viral, mas com um papel importante na indução de apoptose em cultivo celular (LIU et al., 2005).

O capsídeo do PCV2 é a principal proteína imunogênica deste microrganismo (BLANCHARD et al., 2003; MAHE et al., 2000) e tem sido portanto, o alvo para o desenvolvimento de vacinas e testes imunológicos específicos para o PCV2 (HUANG et al., 2011; NAWAGITGUL et al., 2002; PATTERSON et al., 2008;

PATTERSON et al., 2011; SUN et al., 2010).

Pelo menos três genótipos diferentes de PCV2 foram reconhecidos: PCV2a, PCV2b e PCV2c (CORTEY et al., 2011; DUPONT et al., 2008; SEGALLES et al., 2008). Tanto o PCV2a e o PCV2b têm sido associados com manifestações clínicas em diferentes graus de severidade (ALLAN et al., 2007; AN et al., 2007; CIACCI-ZANELLA et al., 2009; GAUGER et al., 2011; LAGER et al., 2007; MADSON et al., 2008; OPRIESSNIG et al., 2006a; OPRIESSNIG et al., 2008), enquanto PCV2c foi relatado somente em alguns rebanhos que não apresentavam manifestação clínica na Dinamarca (DUPONT et al., 2008).

Antes de 2003, os genótipos PCV2a e PCV2b estavam presentes na Europa e na China, enquanto que nos Estados Unidos e Canadá estava presente apenas o PCV2a (ALLAN et al., 2007; CHAE e CHOI, 2010; DUPONT et al., 2008). No entanto, desde 2003, houve uma mudança drástica na prevalência mundial, predominando o PCV2b em populações de suínos comerciais, concomitantemente com aumento da gravidade das manifestações clínicas (CARMAN et al., 2008; CHAE e CHOI, 2010; CHEUNG et al., 2007; CIACCI-ZANELLA, et al., 2009; CORTEY et al., 2011; DUPONT et al., 2008; GAGNON et al., 2007; WANG et al., 2009; WIEDERKEHR et al., 2009). Variações na seqüência genética entre PCV2a e PCV2b são encontrados principalmente no gene do capsídeo. Eventos de recombinação entre os diferentes genótipos de PCV2 podem complicar esta classificação, alterando ainda mais a patogenicidade do PCV2 (MENG, 2012).

### **2.3.2 Aspectos históricos, distribuição e prejuízos econômicos**

O PCV2 é considerado economicamente, um dos agentes patogênicos virais mais importantes em todos os principais países produtores de suínos (GILLESPIE et al., 2009). Foi inicialmente reconhecido em 1998 (ALLAN et al., 1998; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998), mas com base em investigações sorológicas e moleculares, já estava presente na população de suínos, em nível mundial, muitos anos antes de sua descoberta (JACOBSEN et al., 2009). A primeira evidência de infecção por PCV2 foi retrospectivamente encontrado na Alemanha em 1962 (JACOBSEN et al., 2009), enquanto que os primeiros diagnósticos

retrospectivamente estabelecidos de SMDS são da década de 90 (JACOBSEN et al., 2009; RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2003).

A primeira referência à SMDS, doença de etiologia desconhecida que vinha ocorrendo na Europa e nos Estados Unidos foi feita no Canadá em 1991 (CLARK, 1997). Imediatamente diversos outros autores confirmaram essas observações, principalmente na América do Norte, Europa e Ásia (ALLAN et al., 1998; CHOI et al., 2002; ELLIS et al., 1998; HARDING, 1997; MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998) e atualmente já foi descrita em todos os continentes, incluindo a Oceania (GRAU-ROMA et al., 2011). Logo a seguir, uma nova entidade associada ao PCV2, a SDNS foi descrita na Inglaterra (SMITH et al., 1993). Como esta manifestação clínica nunca foi reproduzida experimentalmente (SEGALÉS, 2012), tem sido questionado o mecanismo para o desenvolvimento desta alteração, sendo sugerido que o mesmo decorre de um rápido início de coagulação sistêmica que poderia ser induzida por uma combinação de patógenos endoteliotrópicos ou toxinas, com ou sem a presença de PCV2 (KRAKOWKA et al., 2008).

No Brasil, a primeira descrição da SMDS foi feita em 2000, no Estado de Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA, 2000), sendo, posteriormente, descrito em 2003 no Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003) e em 2004 no estado do Rio de Janeiro (FRANÇA, 2004; FRANÇA et al., 2005). Progressivamente a doença foi diagnosticada nos demais estados brasileiros. A severidade das manifestações clínicas variou muito entre diferentes granjas e, de maneira geral, observou-se que sistemas antigos, com mau manejo ou com higiene deficiente apresentavam problemas mais sérios. Após algum tempo as manifestações iniciais dos sinais típicos de definhamento ou dermatite-nefropatia tornavam-se comuns, bem como as formas entéricas e respiratórias. Num período posterior, os sinais mais típicos passaram a ser de pouca especificidade, observados principalmente na forma de mau desenvolvimento, piora da conversão alimentar ou aumento significativo da mortalidade nas terminações. As lesões de necropsia nessa fase tornaram-se bastante modestas quando comparadas com as presentes nos quadros agudos (iniciais) da doença (BARCELLOS et al., 2009).

Com base em estudos sorológicos, presume-se que a infecção pelo PCV2 é generalizada em todo o mundo, com soropositividade de 100% em alguns rebanhos (SEGALÉS et al., 2005; SEGALÉS, 2012), enquanto que a prevalência da manifestação clínica é muito menor. Apenas uma pequena proporção de animais

infectados (5-30%) realmente desenvolvem a manifestação clínica. Por conseguinte, a forma mais comum de manifestação do PCV2 atualmente é a infecção subclínica (SEGALÉS, 2012).

O PCV2 é eliminado de suínos infectados por várias vias e o vírus pode se espalhar facilmente tanto por transmissão horizontal quanto vertical. Acredita-se que o contato direto entre suínos seja uma eficiente via de transmissão de PCV2. Devido à sua natureza altamente resistente à inativação e suas características de transmissão, o PCV2 pode ser mantido dentro de explorações de suínos sem a necessidade de reintrodução (ROSE et al., 2012).

As manifestações clínicas associadas ao PCV2 no Brasil têm sido frequentes e comuns nas principais regiões produtoras do país, o que acarreta diminuição da produtividade e grandes prejuízos econômicos ao setor (MORÉS, 2005).

Em países como o Reino Unido e França, foi observado um impacto econômico da doença com uma queda de 15% de crescimento por animal (CIACCIZANELLA et al., 2006). Nos Estados Unidos, as perdas foram estimadas em US\$ 3,00 - 4,00 por suíno, chegando a picos de até US\$ 20,00 por animal (GILLESPIE et al., 2009). Tão importante quanto a avaliação clínica dos animais, o acompanhamento dos índices de produção torna-se essencial para detecção de problemas presentes nas granjas, principalmente em se tratando de doenças subclínicas (GUEDES, 2005).

Tão importante como a doença clínica, a infecção subclínica tem ganhado grande atenção nos últimos anos (DARWICH et al., 2008; STEINER et al., 2009). A desuniformidade dos animais de um mesmo lote no momento do abate é um problema que pode comprometer a produtividade e o retorno financeiro, pois alguns animais poderão chegar ao final da vida produtiva com o peso abaixo do esperado, podendo aumentar, significativamente, os custos de produção para atender às exigências da indústria e do mercado (DEEN e LARRIESTRA, 2004). Com a introdução de vacinas comerciais contra PCV2 nas granjas, as formas clínicas da SMDS começaram a ser controladas e, com isso, os prejuízos econômicos diminuíram consideravelmente (CLINE et al., 2008; HORLEN et al., 2008). Porém, a não manifestação da doença clínica não significa que o animal esteja fora do comprometimento produtivo (GRAU et al., 2001; KING et al., 2008).

Embora tenham sido desenvolvidas vacinas comerciais eficazes contra este agente, muitas perguntas permanecem a respeito dos mecanismos moleculares de replicação e patogênese do PCV2 (DARWICH e MATEU, 2012).

### **2.3.3 Patogenia, manifestações clínicas e alterações anatomopatológicas**

A patogenia da PCVAD é complexa e multifatorial. Causa um quadro de imunossupressão por ter tropismo a células de origem histiocítica. O PCV2 geralmente infecta os suínos com 5-15 semanas de idade, frequentemente pela via oronasal (CIACCI-ZANELLA, 2007). Muito se debate acerca de como o PCV2 entra na célula e duas hipóteses tem sido levantadas: através da fagocitose de outras células infectadas (endocitose) ou pela existência de um receptor para PCV2 na superfície de macrófagos. Talvez a presença de PCV2 possa se dar por ambos os mecanismos (DARWICH et al., 2004).

O vírus infecta células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas, e é capaz de replicar em vários tipos celulares, preferencialmente em células com divisão ativa (CIACCI-ZANELLA, 2007). Além das células do sistema imune, a replicação vírica parece ser mais eficiente em tecidos com marcada atividade mitótica, uma vez que o vírus depende de polimerases presentes no núcleo celular do hospedeiro. Sua replicação ocorre durante a fase S do ciclo celular e além das polimerases, requer ainda a participação de várias proteínas das células hospedeiras. A replicação do genoma se inicia logo após a penetração do vírus na célula (TISCHER et al., 1987).

A predileção do PCV2 por macrófagos, monócitos, histiócitos e macrófagos apresentadores de antígenos do pulmão, timo e baço, indica que a patogênese da infecção está associada à disfunção imune, uma vez que este vírus interfere com a função imunológica normal (ZANELLA e MORÉS, 2003). Adicionalmente, ocorre destruição de macrófagos, o que indica um efeito patogênico direto do vírus, aumentando a susceptibilidade a outros agentes (KIM et al., 2002). Os estudos moleculares (AMEISEN et al., 2002; HISCOTT et al., 2001; KARUPPANNAN et al., 2008; LIU et al., 2005; STEVENSON et al., 2007; WEI et al., 2008) têm incriminado uma de suas proteínas (ORF3), como responsável pela patogênese da infecção,



pela indução de apoptose relacionando-a inclusive com a dispersão do PCV2 *in vivo* através de macrófagos e células dendríticas.

Após a infecção e replicação em células do sistema imunológico, o PCV2 produz viremia e se dissemina sistemicamente no organismo, através dos monócitos do sangue (CIACCI-ZANELLA, 2007). Em condições experimentais, o período de incubação da doença pode chegar a 2-4 semanas (ALLAN et al., 1999; BALASH et al., 1999; HARMS et al., 2001), período no qual o acúmulo de vírus necessário para iniciar a doença é alcançado. Quanto maior a quantidade de antígeno vírico detectado, maior a depleção linfóide, maior é a extensão das lesões (CHIANINI et al., 2003; DARWICH et al., 2002; DARWICH et al., 2003; ROSELL et al., 1999;).

Devido à incapacidade do animal infectado desenvolver uma resposta imunológica efetiva, o PCV2 pode infectar células de vários órgãos (pulmões, fígado, rins, intestino), produzir diferentes lesões e, assim, agravar o quadro clínico. Um desequilíbrio das substâncias mediadoras da imunidade, morte de linfócitos e falhas na reposição de células linfóides colaboram para esta imunodeficiência (CIACCI-ZANELLA, 2007).

A relação entre o PCV2 e as células envolvidas na resposta imune difere durante o curso da doença. A presença de macrófagos ativados parece ser um fator essencial no desenvolvimento da doença, enquanto que a imunossupressão é uma consequência em suínos severamente afetados (SEGALÉS et al., 2004). Assim, nas infecções mais avançadas, a depleção linfóide é maior nas áreas foliculares. Em estágios iniciais e intermediários da infecção, ocorre o aumento da população mononuclear fagocitária, atribuída à perda de células linfóides em zonas interfoliculares dos linfonodos e à infiltração por macrófagos nestes órgãos. Nos estágios finais da doença, observaram-se redução de linfócitos T e B (SARLI et al., 2001; SHIBAHARA et al., 2000).

Segundo Darwich e Mateu (2012) todos os suínos de criação comercial são infectados pelo PCV2 em algum momento de suas vidas, porém ainda não está claro porque apenas uma parcela dos animais infectados desenvolve manifestação clínica. Sugere-se que a presença de PCV2 é um fator absolutamente necessário para o desenvolvimento da PCVAD, porém provavelmente, não é um fator suficiente, de forma que existiriam outros fatores que facilitariam ou desenvolveriam a doença sob determinadas condições (QUINTANA et al., 2001; SEGALÉS, 2012).

A explicação para que haja manifestação clínica pode estar relacionada com a presença de co-fatores infecciosos e não-infecciosos, que são responsáveis pelo aumento dos níveis de replicação do PCV2. Sabe-se que os animais que desenvolvem a infecção subclínica apresentam uma carga viral inferior àquela presente nos animais que desenvolvem a manifestação clínica, sobretudo a SMDS. Estes animais também desenvolvem títulos superiores de anticorpos neutralizantes contra o PCV2 (CIACCI-ZANELLA, 2007).

Além da SMDS, o PCV2 tem sido associado a outras manifestações clínicas, tais como desordens reprodutivas (MADSON et al., 2009; MATEUSEN et al., 2007; O'CONNOR et al., 2001), complexo de doenças respiratórias dos suínos (PRDC), enterite (KIM et al., 2004; OPRIESSNIG et al., 2007), síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS) (ALLAN et al., 2000; ROSELL et al., 2000b; WELLENBERG et al., 2004), pneumonia necrosante e proliferativa (PNP) (GRAU-ROMA e SEGALÉS, 2007; SZEREDI e SZENTIRMAI, 2008) e infecção sistêmica associada ao PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2007). Além disso, o tremor congênito tipo A2 foi inicialmente associado à infecção por PCV2 (STEVENSON et al., 2001), mas estudos posteriores sugeriram que não há nenhuma associação entre o vírus e esta condição (HA et al., 2005; KENNEDY et al., 2003).

A infecção sistêmica associada ao PCV2 é caracterizada clinicamente por emagrecimento, baixa condição corporal, depressão, anemia, palidez de pele e mucosas, dificuldades respiratórias, diarreia e ocasionalmente icterícia e úlcera gástrica (DARWICH et al., 2004; HARDING e CLARK, 1997; KRAKOWKA et al., 2004; LARROCHELLE et al., 1999; ROSELL et al., 1999). O aumento dos gânglios linfáticos subcutâneos é um achado comum nas fases iniciais da doença (CLARK, 1997; ROSELL et al., 1999). Mesmo leitões identificados como sobreviventes apresentam falha no crescimento exibindo um deficiente ganho de peso e desuniformidade de carcaça (CIACCI-ZANELLA, 2007).

O PCV2 associado à doença pulmonar e doença entérica envolvem dificuldade respiratória (HARMS et al., 2002; KIM et al., 2003) e diarreia (KIM et al., 2004; OPRIESSNIG et al., 2007), respectivamente, podendo haver uma sobreposição a essas duas condições (OPRIESSNIG et al., 2007), uma vez que ambos os sinais clínicos podem estar facilmente presentes em casos de doença sistêmica.

Na SDNS, os suínos afetados apresentam-se deprimidos e com anorexia, com pouca ou nenhuma febre (DROLET et al., 1999). Podem estar prostrados, relutantes em se mover e/ou exibir dura marcha. O sinal mais evidente é a presença de máculas e pápulas vermelhas à púrpura na pele, principalmente nos membros traseiros e área perineal. Com o tempo, as lesões tornam-se cobertas por crostas escuras. Lesões cutâneas tendem a gradualmente desaparecer, por vezes deixando cicatrizes (DROLET et al., 1999; SEGALÉS et al., 1998). Esta síndrome afeta os animais em fase de creche, crescimento, terminação e suínos adultos (DROLET et al., 1999), sendo que sua prevalência é geralmente inferior a 1% (SEGALÉS et al., 1998).

Lesões renais têm sido amplamente descritas na PCVAD (SEGALÉS et al., 2004). Suínos infectados normalmente exibem nefrite intersticial, que tem sido descrito como nefrite linfoplasmocitária tubulointersticial, nefrite intersticial granulomatosa e tipos mistos. Em todos esses tipos de lesão, o PCV2 é relativamente abundante, não só dentro das células inflamatórias renais, mas também nas células epiteliais (SARLI et al., 2008). Por outro lado, as lesões nos rins em casos SDNS, podem culminar com o desenvolvimento de glomerulite fibrino-necrotizante grave, nefrite intersticial não-supurativa e vasculite necrotizante na pélvis renal (DROLET et al., 1999; SEGALÉS et al., 1998). O PCV2 foi detectado dentro dos infiltrados inflamatórios intersticiais nos rins, bem como em células tubulares renais em casos SDNS (ROSELL et al., 2000b).

Macroscopicamente são encontradas lesões granulomatosas em vários órgãos especialmente linfonodos mesentéricos e inguinais, pulmão, rins e intestino grosso. Além de marcada atrofia do timo em animais severamente afetados (ELLIS et al., 1998; OPRIESSNIG et al., 2007; ROSELL et al., 1999; SEGALÉS et al., 2004). Geralmente há uma evidente linfadenopatia sistêmica, especialmente envolvendo os linfonodos inguinais, mesentéricos, brônquicos e mediastinais que podem apresentar-se brancacentos e homogêneos à superfície de corte. Alterações similares são observadas nas placas de Payer e no baço. O fígado pode apresentar desde uma discreta icterícia até atrofia com acentuada presença de tecido conjuntivo interlobular. Nos rins podem ser observados pontos brancos na córtex renal, edema e aumento de tamanho do órgão. Podem ser encontrados também pulmões com consolidação crânio-ventral e colabamento. No caso de envolvimento do trato gastrointestinal pode haver palidez, edema e ulceração não hemorrágica da porção

paresofágica do estômago, além de espessamento das paredes do intestino com preenchimento por fluido, especialmente no intestino delgado (ALLAN e ELLIS, 2000; OPRIESSNIG et al., 2007; SEGALÉS et al., 2004).

O comprometimento de um ou mais órgãos é bastante variável em animais acometidos pela PCVAD e os fatores que determinam esta característica não estão bem compreendidos, mas podem estar associados à presença de agentes co-infecciosos bacterianos, diferenças entre isolados do vírus, estágio da infecção, além de diferenças genéticas ou da resposta imune do hospedeiro (ALLAN e ELLIS, 2000).

As principais lesões histopatológicas da PCVAD estão relacionadas com o sistema linfocitário, apresentando processos de depleção linfóide (ALLAN et al., 1999; ELLIS et al., 1999; KENNEDY et al., 2000; KRAKOWKA et al., 2002; MOROZOV et al., 1998; ROSELL et al., 1999), perda da arquitetura de órgãos linfóides secundários (CHIANINI et al., 2003; SARLI et al., 2001). Observa-se ainda infiltração histiocitária, que frequentemente contém corpos de inclusão citoplasmáticos, basofílicos e que são vistos como grandes inclusões individuais (sincícios) ou como corpos pequenos múltiplos (ALLAN et al., 1998; FENAUX et al., 2002; ROSELL et al., 1999). Em casos mais crônicos, a depleção linfocitária tende a ser menos severa com menor proliferação de histiócitos e menor infiltração de células gigantes multinucleadas (QUINTANA et al., 2001).

Linfadenite necrosante pode ser encontrada em, pelo menos, um linfonodo em cerca de 10% dos suínos que sofrem de ocorrência natural de PCVDs (SEGALÉS et al., 2004). Essa lesão foi também observada em condições experimentais com suínos que apresentaram depleção linfocitária e inflamação granulomatosa nos linfonodos (OPRIESSNIG et al., 2006a; OPRIESSNIG et al., 2006b). Tal necrose pode afetar grandes áreas do parênquima do linfonodo ou ser focada principalmente em áreas foliculares (SEGALÉS, 2012).

A depleção linfóide afetando células B e células T revela o enorme impacto da infecção por PCV2 sobre o sistema imunológico dos suínos afetados, predispondo-os a outras infecções (DARWICH E MATEU, 2012).

Em geral os sinais clínicos e lesões em decorrência das diferentes manifestações são inespecíficos. Diante de tantas condições associadas ao PCV2, o estabelecimento de critérios para o diagnóstico é algo de grande complexidade (SEGALÉS, 2012).

### 2.3.4 Diagnóstico do PCV2 e doenças associadas

Pelo fato do PCV2 ser um vírus ubíquo, o diagnóstico das síndromes que ocasionam manifestação clínica não pode simplesmente ser baseado na detecção do vírus ou anticorpos contra ele (McNEILLY et al., 2002; OPRIESSNIG et al., 2007; SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Os critérios de diagnóstico são, portanto, considerados muito rigorosos (SEGALÉS, 2012). O diagnóstico definitivo das enfermidades associadas a este agente é então estabelecido com base em três critérios: sinais clínicos compatíveis com a enfermidade; presença de lesões microscópicas nos órgãos linfóides e detecção de antígeno ou ácido nucléico do PCV2 nas lesões (QUINTANA et al., 2001; SORDEN, 2000).

Os métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ* (IHS), imunohistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (IF) (ELLIS et al., 1998; ELLIS et al., 1999; McNEILLY et al., 1999; MOROZOV et al., 1998; ROSELL et al., 1999), assim como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (ALLAN et al., 1999; LAROCHELLE et al., 1999). Não há efeito citopático causado pelo PCV em cultivo celular.

O ácido nucléico ou antígeno de PCV2 é detectado usualmente no citoplasma de histiócitos, células sinciciais e outras células do sistema mononuclear fagocitário tais como os macrófagos alveolares, células de Kupfer e as células dendríticas dos órgãos linfóides (ALLAN e ELLIS, 2000; ROSELL et al., 1999). De forma mais esporádica também pode se detectar o vírus em hepatócitos, em células do epitélio renal e respiratório, endotélios vasculares, linfócitos, células ductulares e acinares pancreáticas, células musculares lisas e enterócitos (McNEILLY et al., 1999; ROSELL et al., 1999; SIRINARUMITR et al., 2000). Entretanto, também é possível detectar o PCV2 em suínos clinicamente normais; nestes casos, a quantidade de vírus é muito baixa e a intensidade das lesões é muito leve (QUINTANA et al., 2001).

Os resultados positivos em suínos sadios ou suínos portadores de outras enfermidades devem ser interpretados cautelosamente; em geral, são aceitas três possíveis interpretações para estes resultados: 1) Infecção subclínica por PCV2 (portanto neste caso, não se estabelece o diagnóstico da enfermidade clínica em nenhum dos casos); 2) Suínos na fase inicial da infecção (talvez estes animais acabariam desenvolvendo a manifestação clínica); 3) Suínos em fase convalescente

da doença (animais que manifestaram clinicamente a enfermidade, porém se encontram em fase de recuperação) (QUINTANA et al., 2001).

### **3 DESENVOLVIMENTO**

3.1 DIAGNÓSTICO DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA PELA INSPEÇÃO SANITÁRIA *POST-MORTEM*: COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Enviado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis A2)

## Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela inspeção sanitária *post-mortem*: comparação com outros métodos de diagnóstico<sup>1</sup>

Kênia de F. Carrijo<sup>2\*</sup>, Elmiro R. do Nascimento<sup>3</sup>, Virgínia Léo de A. Pereira<sup>3</sup>, Nelson Morés<sup>4</sup>, Catia S. Klein<sup>4</sup>, Leonardo M. Domingues<sup>5</sup> e Rogerio Tortelly<sup>6</sup>

**ABSTRACT.**-Carrijo K.F., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Morés, N., Klein, C.S., Domingues L.M. & Tortelly R. 2012. [Diagnostic of porcine enzootic pneumonia by *post mortem* sanitary inspection: comparison with other methods of diagnosis.] Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela inspeção sanitária *post mortem*: comparação com outros métodos de diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: [keniacarrijo@famev.ufu.br](mailto:keniacarrijo@famev.ufu.br)

To compare the concordance of the diagnosis of porcine enzootic pneumonia (PEP) by *post-mortem* Sanitary Inspection with other methods (histopathology and immunohistochemistry- IHC), we used lung tissue samples from 100 pigs slaughtered under sanitary inspection, and 50 of these had macroscopic lesions suggestive of PEP and 50 had no such lesions. These were fixed in 10% buffered formalin and processed by routine procedures for paraffin embedding and IHC technique for *Mycoplasma hyopneumoniae* using a monoespecific polyclonal antibody. The study demonstrating that there is concordance between the diagnosis of Sanitary Inspection with histopathology, between the diagnosis of Sanitary Inspection with IHC and histopathology with IHC. It can be conclude that when the lung has gross lesions, the probability the result is positive in IHC and the presence of microscopic lesions increases. Thus, the microscopic diagnosis for PEP is feasible because it is associated to the other, so that the diagnosis given by the officials of Sanitary Inspection in slaughterhouses is not wrong; the macroscopic diagnosis is therefore a valid method for the diagnosis of PEP, it being understood this is not to say that the detection of *M. hyopneumoniae*.

INDEX TERMS: Porcine enzootic pneumonia, *post mortem* sanitary inspection, diseases of swine, histopathology, immunohistochemistry.

**RESUMO.**- Para a comparação da concordância do diagnóstico de pneumonia enzoótica suína (PES) pela Inspeção Sanitária *post-mortem* com outros métodos (histopatologia e imunohistoquímica - IHQ), foram utilizadas amostras de tecido pulmonar de 100 suínos abatidos em um matadouro-frigorífico sob inspeção sanitária, sendo que destes 50 eram portadores de lesões macroscópicas sugestivas de PES e 50 não tinham tais lesões. Estas foram conservadas em formalina 10% tamponada e submetidas às técnicas habituais para inclusão em parafina e IHQ para *Mycoplasma hyopneumoniae* usando-se um anticorpo policlonal monoespecífico. O estudo demonstrou que há concordância entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária com a histopatologia, entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária com a IHQ e da histopatologia com a IHQ. Pode-se concluir que quando os pulmões tem lesões macroscópicas, a probabilidade de o resultado ser positivo na IHQ e a presença de lesões microscópicas aumenta. Assim, o diagnóstico macroscópico para PES é factível porque está associado aos demais, de forma que o diagnóstico conferido pelos funcionários da Inspeção Sanitária nos matadouros não está equivocado; o diagnóstico macroscópico é, portanto um método válido para o diagnóstico de PES, entendendo-se que isto não significa dizer que seja a detecção de *M. hyopneumoniae*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pneumonia enzoótica suína, inspeção sanitária *post mortem*, doenças de suínos, histopatologia e imunohistoquímica.

### INTRODUÇÃO

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES), cujo principal agente etiológico envolvido é o *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma enfermidade respiratória crônica que acomete o sistema respiratório de suínos de produção intensiva. Causa significativas perdas econômicas para os produtores e para a indústria, em função da piora na conversão alimentar, atraso no ganho de peso, gastos com medicamentos e principalmente, predisposição a infecções secundárias com consequente depreciação das carcaças (Ross 1999).

Dentro deste contexto, a avaliação de órgãos de suínos em matadouro é de elevada importância



em diversas áreas de saúde animal. Inicialmente, estas avaliações foram usadas no diagnóstico de enfermidades subclínicas, bem como para confirmar a presença de doenças clinicamente evidentes, de forma a se obter um indicativo do agente etiológico envolvido e a prevalência desta condição no rebanho. Posteriormente, os matadouros foram usados para monitorar a eficiência de algumas estratégias de controle de doenças através da comparação da prevalência e severidade das lesões no abate antes e após a implantação de mudanças entre grupos de teste e medidas de controle. Atualmente, as avaliações nos matadouros provaram ser de valor, tanto na pesquisa como na identificação de lesões provocadas por quadro clínico, observado nas granjas, quando se suspeita estarem presentes na sua forma subclínica ou na sua forma crônica (Sobestiansky et al. 2001).

É no exame *post-mortem*, realizado nos frigoríficos por fiscais sanitários, que as lesões por PES são identificadas mediante exames macroscópicos, indicando a situação de saúde do rebanho e gerando dados que podem ser relevantes em estudos epidemiológicos e econômicos da enfermidade (Maes et al. 2001, Walker & Bilkei 2006, Martínez et al. 2007). Dessa maneira, não há dúvidas de que os dados obtidos pela Inspeção Sanitária no matadouro constituem um importante subsídio para a avaliação das perdas econômicas (Carrijo et al. 2008).

Na literatura, apesar de existir numerosos relatos comparando resultados de diagnóstico das lesões pulmonares na inspeção sanitária com resultados sorológicos (Mousing et al. 1990, Bahnson et al. 1994, Morris et al. 1995), são escassos os trabalhos que comparam a eficiência do diagnóstico macroscópico com outros métodos de diagnóstico, como por exemplo, a histopatologia (microscopia) e a Imunohistoquímica (IHQ) a fim de verificar a o grau de concordância entre estes.

A partir do exposto, o presente trabalho teve como objetivo comparar a concordância dos diagnósticos de pulmões com lesões sugestivas de PES na Inspeção Sanitária *post-mortem*, realizada por funcionários do Serviço de Inspeção Sanitária com outros métodos de diagnóstico (histopatologia e IHQ), mediante a realização de um estudo observacional do tipo caso-controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas amostras de tecido pulmonar de 100 suínos abatidos sob inspeção sanitária em um matadouro-frigorífico do estado de Santa Catarina, durante o mês de fevereiro de 2011. Foram estabelecidos dois grupos, cada um com 50 animais, tratando-se de um estudo epidemiológico do tipo caso-controle. O grupo caso foi representado por suínos portadores de lesões macroscópicas sugestivas de PES (Fig.1), enquanto que o grupo controle foi representado por suínos sem as referidas lesões, ambos diagnosticados durante o abate, por funcionários do Serviço de Inspeção do estabelecimento. Para cada amostra caso, era obtida em seguida uma amostra controle de forma alternada, com o cuidado de que este conjunto fosse do mesmo plantel. As amostras utilizadas no grupo caso foram retiradas do lobo pulmonar que apresentava maior extensão de lesão macroscópica. No grupo controle, as amostras foram coletadas no lobo correspondente ao que foi coletado no grupo caso. Cada fragmento foi acondicionado em frascos separados, contendo formalina a 10% tamponada, sendo posteriormente processados para a histopatologia, através das técnicas habituais para inclusão em parafina (Allen 1992). De cada animal foram obtidos dois cortes histológicos a partir dos blocos: um foi corado com hematoxilina-eosina (para ser realizado o diagnóstico histopatológico ou microscópico de rotina) e o outro foi tratado e corado, segundo a técnica de imunohistoquímica proposta por Gava et al. (2008), para identificar, a presença de antígenos de *M. hyopneumoniae* nos tecidos (Fig.2). Nesta, utilizou-se um anticorpo policlonal monoespecífico contra a proteína recombinante do *M. hyopneumoniae* p36 produzido e cedido pelo Programa de Investigação de Genomas Sul - PIGS, na diluição 1:2400. Como controle positivo foram utilizados cortes de pulmões de suínos livres de patógenos específicos (SPF) inoculados experimentalmente com este microrganismo e com diagnóstico confirmado pela Nested-PCR (N-PCR). Como controle negativo foram utilizados cortes de pulmões de animais SPF, também testados pela N-PCR. Tais controles foram gentilmente cedidos pelo Dr. Nelson Morés, Laboratório de Patologia, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

No exame histopatológico, seguiu-se os critérios de classificação por escore descritos por Van Alstine et al. (1996), Irigoyen et al. (1998) e Scofano (2006). A reação peribronquial foi graduada como escore zero quando não eram observados nódulos peribronquiais de constituição mononuclear, indicando ausência de lesão; escore um quando pequenos nódulos estavam presentes em menos de 25% dos brônquios, bronquíolos e vasos; escore dois quando pequenos nódulos estavam presentes em 25-75% dessas estruturas e escore três quando estavam presentes em mais de 75% das estruturas ou devido à presença de grandes nódulos (Fig.3). Foram considerados como negativos, os pulmões com escores microscópicos zero e um e positivos os que apresentaram escore microscópico dois e três.

Para a interpretação do exame de IHQ, adotou-se a metodologia proposta por Lorenzo et al. (2006), que estabelecem o resultado como negativo, quando nenhum sinal foi detectado (escore zero) e positivo (escores que variam de um a três). O escore um indica uma fraca quantidade de antígeno no epitélio ciliado de pelo menos um brônquio/bronquíolo; escore dois, moderada quantidade de antígeno na superfície de um pequeno número de brônquios/bronquíolos e três, quando há uma grande quantidade de antígeno na superfície de muitos brônquios e bronquíolos.

Os resultados foram armazenados em banco de dados e analisados por meio dos softwares InStat e BioEstat 5.0, obtendo-se a frequência de casos positivos e negativos, tanto na macroscopia quanto na microscopia e IHQ. Os Testes de Fisher e McNemar com alfa igual a 5% foram utilizados para verificar a significância entre os métodos de diagnóstico. A razão de chances ("Odds Ratio") foi calculada a fim de se verificar a associação entre os referidos métodos de diagnóstico.

O Índice de concordância ajustada (Kappa), que exclui as concordâncias ao acaso, foi calculado para demonstrar o relacionamento entre os exames macroscópico e microscópico, macroscópico e IHQ, microscópico e IHQ indicando a concordância entre si (Thrusfield 2004). A interpretação do coeficiente de Kappa ( $\kappa$ ) seguiu os seguintes critérios propostos por Pereira (1995):

Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Diagnóstico macroscópico x microscópico da PES

Pode-se verificar no quadro 1, que dos 50 animais diagnosticados como positivos para PES (grupo caso), segundo os funcionários do Serviço de Inspeção Sanitária na avaliação *post-mortem* (macroscopia), todos foram positivos também na microscopia. No grupo controle (negativos para a PES na macroscopia), dos 50 animais avaliados, 47 (94%) também foram diagnosticados como negativos na microscopia. Os três casos (6%) positivos neste exame constituíram os casos discordantes.

O teste exato de Fisher para se verificar a significância entre diagnóstico de casos microscópicos com o diagnóstico de casos macroscópicos (inspeção *post-mortem*) de PES, revelou associação significativa ( $p < 0,001$ ) entre os mesmos. Foi ainda calculado o "Odds Ratio", obtendo-se 1.370,1 (69,910-27.266) como resultado. Dessa forma, animais com presença de lesões macroscópicas de pulmão apresentam 1370,1 vezes mais chances de ter também lesões na microscopia em relação aqueles sem lesão macroscópica ( $p < 0,001$ ).

A taxa geral de concordância entre os dois métodos de diagnóstico foi de 97% e o valor de Kappa ( $\kappa$ ) foi igual a 0,94 (94%), indicando uma ótima concordância entre eles ( $p < 0,001$ ). Consequentemente, o nível de reprodutibilidade entre eles é classificado como excelente. A taxa de concordância encontrada no presente trabalho foi superior aquela encontrada por Carrijo et al. (2008) em estudo também do tipo caso-controle, cuja taxa geral de concordância entre os dois métodos de diagnóstico (macroscopia *versus* microscopia) foi de 80,44% e o valor de Kappa foi de 0,62 (62%), considerado de "boa concordância".

A concordância significativa obtida na comparação entre os dois métodos de diagnóstico (macroscopia e microscopia) para PES (ou seja, a detecção da lesão, não necessariamente causada exclusivamente pelo *M. hyopneumoniae*) permite-se afirmar que os referidos métodos possuem o mesmo valor diagnóstico, ou muito próximo, apesar da existência de casos negativos discordantes. Ribeiro et al. (2004), também verificaram uma correlação positiva entre os diagnósticos macroscópico e microscópico para esta enfermidade, indicando correspondência entre essas manifestações, além de demonstrar o valor preditivo destas alterações para fins de diagnóstico.

A existência dos negativos discordantes (ausência de lesões macroscópicas, porém com alterações microscópicas) pode ser justificada em função da idade em que os animais foram infectados e em qual fase da enfermidade foram abatidos. Segundo Blanchard et al. (1996) as lesões macroscópicas podem não ser

observadas em casos que o animal se infectou poucas semanas antes do abate, não havendo ainda tempo suficiente para que as lesões macroscópicas se apresentem na superfície do órgão. Nogueira (1996) complementa tal informação, afirmando que as lesões só podem ser vistas entre 7 e 28 dias após a infecção.

Outra possibilidade, segundo Irigoyen et al. (1998) e Van Alstine et al. (1996) refere-se aos animais que se infectaram, porém tiveram regressão das lesões superficiais. Segundo Kobisch et al. (1993) a recuperação destas pode ocorrer por volta das 8-12 semanas após a exposição. Dessa forma, se os animais se infectaram no início de suas vidas, estas lesões macroscópicas poderiam já ter regredido na ocasião do abate, embora as alterações microscópicas permanecessem.

### **Diagnóstico macroscópico da PES x IHQ para *M. hyopneumoniae***

Quando se comparou o diagnóstico macroscópico dos 50 pulmões portadores de lesões sugestivas de PES (grupo caso), realizado pelos Fiscais do Serviço de Inspeção Sanitária, com a IHQ para *M. hyopneumoniae*, (Quadro 2), pode-se verificar que em 82% (41/50) deles foi verificada a presença de *M. hyopneumoniae*. Pelo cálculo do "Odds ratio", pode-se verificar que animais com a presença de lesões macroscópicas pulmonares apresentam 2,25 vezes mais chances de ser detectada a presença de *M. hyopneumoniae* pela IHQ em relação aqueles sem lesão macroscópica ( $p < 0,001$ ). O teste de McNemar evidenciou que animais com lesões macroscópicas de pulmão apresentaram maior probabilidade de ser detectado o *M. hyopneumoniae* por meio da IHQ, do que aqueles que não tinham lesões macroscópicas, porém esta probabilidade não é significativa ( $p = 0,2668$ ). No entanto, nos pulmões do grupo controle (sem lesões macroscópicas de PES), foi verificada a presença deste agente em 8% (4/50) deles. A taxa geral de concordância entre os dois métodos foi de 87% e o valor de "*kappa*" foi igual a 0,74 (74%), indicando boa concordância entre eles, e esta é significativa ( $p < 0,0001$ ). Desta forma, verifica-se que estes dois métodos estão relacionados.

Ao analisar os resultados apresentados, deve-se levar em consideração que o diagnóstico macroscópico é baseado na presença de lesões sugestivas de PES, que tem como agente etiológico primário, o *M. hyopneumoniae*. No entanto, outros agentes virais e bacterianos secundários podem estar presentes, exacerbando tais lesões (Ciprian et al. 1988, Sørensen et al. 1997, Marois et al. 2009, Opriessnig et al. 2004). Em virtude do *M. hyopneumoniae* ter sido detectado em 82% dos pulmões com lesões, constata-se que a grande maioria delas está associada a este agente e que o diagnóstico conferido pelos funcionários do Serviço de Inspeção Sanitária para PES é válido.

Apesar do diagnóstico macroscópico ter possibilitado a verificação da associação das lesões pulmonares com o *M. hyopneumoniae*, este agente foi detectado em 92% dos pulmões que não tinham lesão, confirmando que a detecção deste agente por si só nem sempre está acompanhada de lesões de pneumonia (Thacker 2004), as quais, se estivessem presentes, acarretariam a condenação do órgão no momento do abate.

### **Diagnóstico microscópico da PES x IHQ para *M. hyopneumoniae***

Quando se avaliou a associação entre o diagnóstico microscópico da PES, baseado em características específicas de que seja uma infecção ocasionada pelo *M. hyopneumoniae*, com a IHQ para este agente, pode-se verificar que na microscopia, dentre os 53 casos positivos, 43 (81,2%) também foram positivos na IHQ. E dentre os 47 casos negativos na microscopia, 45 (95,75%) também foram negativos para a IHQ, conforme pode-se observar no quadro 3. Pelo Teste de McNemar, verificou-se que os dois métodos estão associados de forma significativa ( $p = 0,0386$ ) e aqueles animais com diagnóstico positivo para *M. hyopneumoniae* pela IHQ apresentam 96,75 vezes ( $OR = 95,7500$ ) mais chances de também apresentar lesões microscópicas para PES do que aqueles negativos ( $p < 0,0001$ ).

A taxa geral de concordância entre os dois métodos foi de 88% e o valor de "*kappa*" foi igual a 0,77 (77,14%), indicando boa concordância e excelente replicabilidade entre os dois métodos. Ribeiro et al. (2004) também verificaram uma associação significativa entre as técnicas microscópica e imunohistoquímica, por meio da correlação positiva das mesmas, indicando que a presença de lesão está associada à presença de *M. hyopneumoniae*.

Quanto aos 10 casos em que não foi detectado o *M. hyopneumoniae* pela IHQ (18,8%) e que, no entanto, foram positivos para PES na microscopia, esta situação pode estar relacionada à quantidade variável de antígeno no tecido pulmonar, dependendo do estágio de infecção e locais de lesões mais desenvolvidas. Segundo Feenstra et al. (1994), nos casos agudos da enfermidade, devido ao maior número de células de *M. hyopneumoniae* presentes, a probabilidade de se obter resultados positivos no diagnóstico pela IHQ é aumentada; porém, nas infecções crônicas, a sensibilidade do método diminui devido ao baixo

número de microrganismos. Doster & Lin (1988) também citam que animais cronicamente afetados podem exibir pequena concentração de microrganismos, justificando em determinadas situações, a ausência de imunomarcção. Bashiruddin et al. (1999) consideram ainda que as áreas com maior concentração de antígenos correspondem aos locais de lesões mais desenvolvidas e dependendo do corte histológico, áreas com menor concentração de antígenos podem ser obtidas, ocasionando imunomarcção mais tênue ou até mesmo ausente.

Além disso, a presença de lesões de PES, porém sem a detecção do *M. hyopneumoniae* na IHQ, pode estar relacionada, possivelmente à medicação com antimicrobianos em alimentos e/ou em água, com ação sobre este agente, a fim de combater a infecção nos animais alojados na granja até o início da fase de terminação (Vicca et al. 2004), porém as lesões ainda não haviam regredido totalmente até a ocasião do abate. Deve-se ainda considerar a possibilidade de medicação individual injetável para os animais que apresentaram manifestação clínica no período de terminação usando drogas com período de retirada compatível com a data de abate (Ross 1999).

Assim, mesmo sendo detectadas nas lesões de PES características indicativas de infecções crônicas pelo *M. hyopneumoniae*, como hiperplasia de nódulos linfóides peribronquiais e peribronquiolares, por exemplo (ROSS 1992), a quantidade de células necessárias para que houvesse imunomarcção pode não ter sido suficiente, sendo estes casos julgados como negativos quanto à presença deste agente etiológico.

### CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que há concordância entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária com a histopatologia, da Inspeção Sanitária com a IHQ e da histopatologia com a IHQ.

Portanto, conclui-se que quando os pulmões tem lesão macroscópica, a probabilidade de o resultado ser positivo na IHQ e a presença de lesões microscópicas aumenta. Assim, o diagnóstico macroscópico para PES é factível porque está associado aos demais, de forma que o diagnóstico conferido pelos funcionários da Inspeção Sanitária nos matadouros não está equivocado; o diagnóstico macroscópico é, portanto um método válido para o diagnóstico de PES, entendendo-se que isto não significa que seja a detecção de *M. hyopneumoniae*.

**Agradecimentos.**- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro; À Embrapa Suínos e Aves, em especial ao Dr. Nelson Morés e equipe pelo fornecimento das amostras controle para a Imunistoquímica.

### REFERÊNCIAS

- Allen T.C. 1992. Hematoxylin and eosin, p.53-58. In: Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (Eds), Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Washington.
- Bahnson P.B., Marsh W.E. & Dial G.D. 1994. The associations among serology to *M. hyopneumoniae*, lung lesions at slaughter and a clinical index of cough in groups of growing pigs. Anais 13<sup>o</sup> International Congress on Pig Veterinary Society, Bangkok, Thailand, p.131. (Resumo).
- Bashiruddin J.B., Santini F.G., De Santis P., Visaggio M.C., Di Francesco G., D'angelo A. & Nicholas R.A. 1999. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* tissue from an outbreak of contagious bovine pleuropneumonia by culture, immunohistochemistry and polimerase chain reaction. Vet. Rec. 145:271-274.
- Blanchard B., Kobisch M., Bové J.M. & Saillard C. 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. Mol. Cell. Probes. 10:15-22.
- Carrijo K.F., Nascimento E.R., Santos I.F., Chagas E., Kuiava L. & Tortelly R. 2008. Comparação entre os diagnósticos pela inspeção sanitária post-mortem e histopatologia da pneumonia enzoótica suína: estudo de caso-controle. Rev. Bras. Ciência Vet. 15:77-81.
- Ciprian A., Pijoan C., Cruz T., Camacho J., Tórtora J., Colmenares G., López-Revilla R. & De la Garza M. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida*. Can. J. Vet. Res. 52:434-438.
- Doster A.R. & Lin B.C. 1988. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. 49:1719-21.
- Feenstra A.A., Sørensen V., Friis N.F., Jensen N.E. & Bille-Hansen V. 1994. Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In: Prachak P. & Prongsri I. (Eds), Proceedings 13<sup>o</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand, p.26-30. (Resumo)

- Gava D., Castro L.A., Oliveira S.R. & Morés N. 2008. Avaliação de diferentes formas de recuperação antigênica na técnica de imunohistoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmões de suínos. Anais Fórum Internacional da Suinocultura, Curitiba, PR, p.56-57. (Resumo)
- Irigoyen L.F., Alstine W.V., Turek J. & Clark L.K. 1998. Ultrastructural observation of the airways of recovered and susceptible pigs after inoculation with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Pesq. Vet. Bras. 18:1-7.
- Kobisch M., Blanchard B. & Le Potier M.F. 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs duration of the disease and resistance to reinfection. Vet. Res. 24:67-77.
- Lorenzo H., Quesada O., Assunção P., Castro A. & Rodríguez F. 2006. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Immun. Immunopathol. 109:199-207.
- Maes D.G., Deluyker H., Verdonck M., Castruyck F., Miry C., Vrijens B., Ducatelle R. & De Kruif A. 2001. Non-infectious factors associated with macroscopic and microscopic lung lesions in slaughter pigs from farrow-to-finish herds. Vet. Rec. 148:41-46.
- Marois C., Gottschalk M., Morvan H., Fable 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: 283-291.
- Martínez J., Jaro P.J., Aduriz G., Gómez E.A., Peris B. & Corpa J.M. 2007. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. Vet. J. 174:160-164.
- Morris C.R., Gardner I.A., Hietala S.K. & Carpenter T.E. 1995. Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. Prev. Vet. Med. 59:197-204.
- Mousing J., Lybye H., Barfod K., Meyling A., Rønsholt L. & Willeberg P. 1990. Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system-related risk factors. Prev. Vet. Med. 9:107-119.
- Nogueira R.H.G. 1996. Micoplasmose pulmonar no suíno. Anais 3º Encontro De Médicos Veterinários Do Nordeste, João Pessoa, PB, p.19. (Resumo)
- Opriessnig T., Thacker E.L., Yu S., Fenaux M., Meng J. & Halbur P.G. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. Vet. Pathol. 41:624-640.
- Pereira M.G. 1995. Epidemiologia: teoria e prática. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 596p.
- Ribeiro F.C., Silva J.C.P., Santos J.L. & Pontes K.C.S. 2004. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56:709-714.
- Ross R.F. 1992. Mycoplasmal diseases, p.537-551. In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., Dallaire S.D. & Taylor D.J. (Eds), Disease of Swine. 7<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames.
- Ross R.F. 1999. Mycoplasmal diseases, p.495-510. In: Straw B.E., Mengeling W.L. & Taylor D.J. (Eds), Diseases of swine. 8<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames.
- Scofano A.S. 2006. Pneumonia Enzoótica suína: diagnóstico anátomo-patológico, prevalência e efeitos sobre o desenvolvimento da carcaça. Dissertação de Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 51p.
- Sobestiansky J., Matos M.P.C. & Souza C.M. 2001. Monitoria patológica de suínos em matadouros. Art. 3 Impresses Especiais, Goiânia. 52p.
- Sørensen V., Ahrens P., Barfod K., Feenstra A.A., Feld N.C., Friis N.F., Bille-Hansen V., Jensen N.E. & Pedersen M.W. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet. Microbiol. 54: 23-34.
- Thacker E.L. 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Anim. Health Res. Rev. 5:317-320.
- Thrusfield M. 2004. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. Roca, SP. 596p.
- Van Alstine W.G., Stevenson G.W. & Kanitz C.L. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. Vet. Microbiol. 49:297-303.
- Vicca J., Stakenborg T., Maes D., Butaye P, Peeters J, De Kruif A. & Haesebrouck F. 2004. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 48:4470-4472.
- Walker P.K. & Bilkei G. 2006. Tail-biting in outdoor pig production. Vet. J. 171:367-369.

### Legenda das Figuras

Fig.1. Suíno. Pulmão. Lesões sugestivas de PES. Acometimento bilateral (setas). Parte dos lobos apresentam tonalidade arroxeada.

Fig.2. Marcação positiva acentuada vermelha de antígenos na superfície de um bronquíolo. Anticorpo policlonal mono específico anti p36 de *M. hyopneumoniae* 1:2400. Imunohistoquímica pelo método LSAB e contra corada com hematoxilina de Harris, obj.40x.

Fig.3. Suíno. Pulmão. Pneumonia enzoótica suína. Escore 3, presença de grandes nódulos (N) de mononucleares. H.E., obj.10x.

### Os Quadros

**Quadro 1. Relação entre os diagnósticos macroscópico e microscópico da PES em suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011, em um estudo tipo caso-controle\***

Casos	Casos Microscópicos			
	Macroscópicos	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos		50 (50,0)	0 (0,0)	50 (100)
Negativos		3 (6,0)	47 (94,0)	50 (100)
<b>Total</b>		<b>53 (53,0)</b>	<b>47 (47,0)</b>	<b>100 (100)</b>

\*Taxa geral de concordância: 97%; Kappa= 94% (ótima concordância -  $p < 0,001$ ); Teste Exato de Fisher significativo ( $p < 0,001$ ); OR: 1370,1 (69,910-27266,00).

**Quadro 2. Relação entre os diagnósticos macroscópico da PES e da Imunohistoquímica (IHQ) para *M. hyopneumoniae* em suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011, em um estudo tipo caso-controle\***

Macroscopia	IHQ - <i>M. hyopneumoniae</i>			
	PES	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos		41 (82,0)	9 (18,0)	50 (100)
Negativos		4 (8,0)	46 (92,0)	50 (100)
<b>Total</b>		<b>45 (45,0)</b>	<b>55 (55,0)</b>	<b>100 (100)</b>

\*Taxa geral de concordância: 87%; Kappa= 74% (boa concordância -  $p < 0,0001$ ; McNemar não significativo ( $p = 0,2668$ ); OR: 2,25 (0,6361-8,659).

**Quadro 3. Relação entre os diagnósticos microscópico da PES e do *M. hyopneumoniae* pela IHQ em suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011, em um estudo tipo caso-controle\***

Microscopia	IHQ - <i>M. hyopneumoniae</i>			
	PES	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos		43 (81,2)	10 (18,8)	53 (100)
Negativos		2 (4,25)	45 (95,75)	47 (100)
<b>Total</b>		<b>45 (45,0)</b>	<b>55 (55,0)</b>	<b>100 (100)</b>

\*Taxa geral de concordância: 88%; Kappa= 76,14% (boa concordância -  $p = 0,0001$ ); McNemar significativo ( $p = 0,0209$ ); OR: 96,75 (20,0341-467,2323).

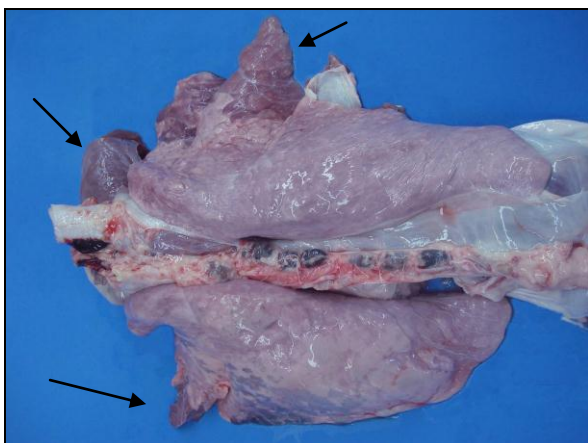


Figura 1

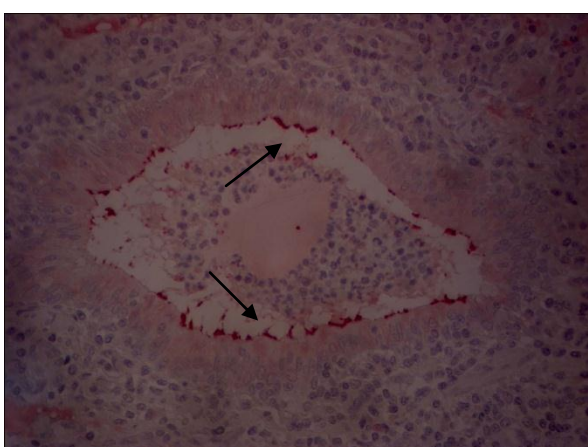


Figura 2

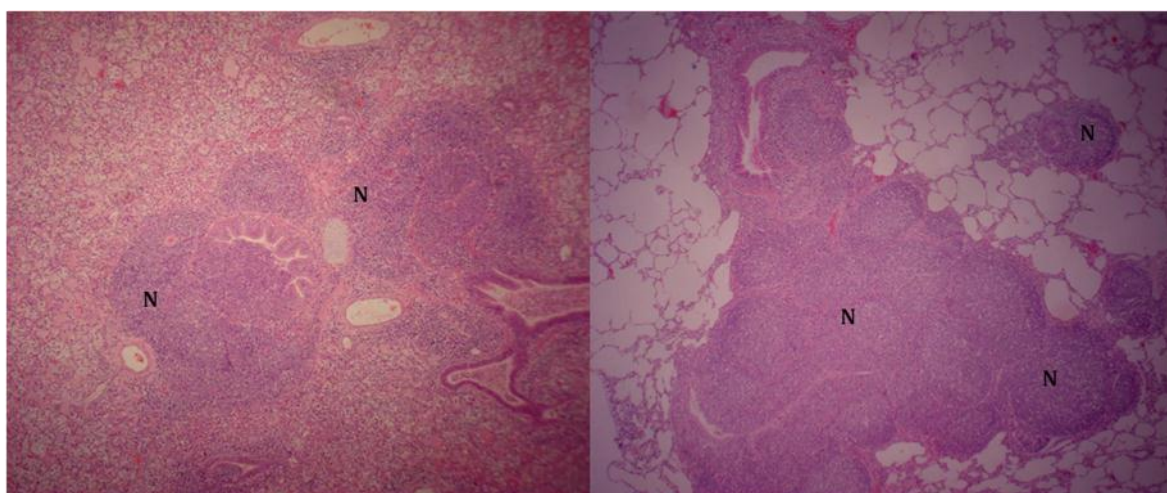


Figura 3

3.2 *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E  
*LEPTOSPIRA* spp. NA ETIOLOGIA DE NEFRITES EM SUÍNOS DE ABATE COM  
OU SEM LESÕES DE PNEUMONIA ENZOÓTICA

Enviado para o periódico “Journal of Veterinary Diagnostic Investigation” (Qualis B1)  
em sua versão traduzida para a língua inglesa.



***Mycoplasma hyopneumoniae*, Circovírus suíno tipo 2 e *Leptospira* spp. na etiologia de nefrites em suínos de abate com ou sem lesões de Pneumonia Enzoótica**

Kênia de Fátima Carrijo<sup>1\*</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>, Nelson Morés<sup>3</sup>, Janice Reis Ciacci-Zanella<sup>3</sup>, Catia Silene Klein<sup>3</sup>, Rogerio Tortelly<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup>Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPSA-EMBRAPA.

<sup>4</sup>Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense

\*e-mail: keniacarrijo@famev.ufu.br

***Mycoplasma hyopneumoniae*, Circovírus suíno tipo 2 e *Leptospira* spp. na etiologia de nefrites em suínos de abate com ou sem lesões de Pneumonia Enzoótica**

**Abstract.** *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovirus Suíno Tipo 2 (PCV2) são os dois patógenos mais prevalentes na suinocultura tecnificada, causando perdas pela redução na taxa de crescimento e eficiência alimentar. Foi verificado em estudo prévio, que suínos com lesões pulmonares de Pneumonia Enzoótica Suína (PES) tem maior predisposição para desenvolverem nefrite. Outros estudos sugerem que este agente possui a capacidade de colonizar diferentes tecidos, além do trato respiratório. O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar possíveis lesões renais inflamatórias quanto ao aspecto e localização do infiltrado inflamatório e associá-las à presença de *M. hyopneumoniae*, PCV2 e *Leptospira* spp. como agentes etiológicos, a fim de comprovar a associação entre lesões pulmonares de PES e lesões renais com envolvimento do *M. hyopneumoniae*, por sua detecção concomitante com o tecido renal de suínos de terminação abatidos sob inspeção. Foram analisados 100 rins de suínos de terminação (110 dias de idade), sendo que 64% apresentavam lesões microscópicas. 72% (36/50) dos animais com lesões pulmonares de PES apresentaram concomitantemente lesão renal e 44% (22/50) apresentaram diagnóstico negativo para as duas situações. O *M. hyopneumoniae* foi detectado em 96% (96/100) e o PCV2 em 86 (86/100), sendo que em 96,87 (62/64) dos rins com lesões microscópicas foi detectado o *M. hyopneumoniae*. A detecção conjunta dos dois agentes no tecido renal foi de 82% (82/100), sendo que nos rins com lesão, a presença destes dois agentes foi detectada em 85,94% (55/64). Com relação ao infiltrado inflamatório renal, o aspecto difuso (41%) e a localização intersticial (40%) foram os mais frequentes. A *Leptospira* spp. não está associada às lesões renais, porém o PCV2 e o *M. hyopneumoniae* estão, sendo comprovada a hipótese de que este último agente pode ser detectado no tecido renal de suínos de terminação na ocasião do abate, tanto em rins com lesão quanto naqueles sem lesão. No entanto não se sabe se o mesmo pode

ocasionar lesões. Mesmo diante da verificação da presença destes dois agentes no rim, as lesões renais foram brandas. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre a patogenia renal de *M. hyopneumoniae*. Além disso, é necessário que seja verificada se a presença conjunta de PCV2 e de *M. hyopneumoniae* é uma associação sinérgica e capaz de provocar lesão.

**Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*; PCV2; inspeção sanitária; nefrite.

## Introdução

Os dois patógenos mais prevalentes encontrados na suinocultura tecnificada atual são o *Mycoplasma hyopneumoniae* e Circovirus Suíno Tipo 2 (PCV2), que causam prejuízos econômicos significativos. O primeiro deles está relacionado principalmente a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), uma enfermidade respiratória crônica e o segundo é considerado um patógeno emergente, o qual está associado a diferentes síndromes e que pode ocasionar inclusive nefrites<sup>17</sup>. Dentro deste contexto, as lesões renais em suínos ocupam um lugar de destaque na suinocultura moderna<sup>32</sup>, podendo ser ocasionadas por diversos agentes tóxicos ou infecciosos, respostas imunomediadas e outras causas desconhecidas<sup>2</sup>.

Por muitos anos, a bactéria *Leptospira interrogans* foi associada às lesões inflamatórias renais<sup>4,13,21,34</sup> além de outros agentes como por exemplo, o PCV2<sup>43</sup>. Porém, alguns estudos falharam em demonstrar a associação de alguns destes agentes a essas lesões<sup>8,16,31,37</sup>. Uma série de patógenos foram pesquisados a fim de associar sua presença com tais lesões e foi verificado que nenhum dos agentes infecciosos detectados poderia ser diretamente atribuído como causa primária de nefrite nos rins analisados<sup>31</sup>.

Apesar de alguns estudos<sup>7,45</sup>, os autores não evidenciaram que o *M. hyopneumoniae* seja capaz de atravessar a barreira de células epiteliais do trato respiratório, alguns autores afirmam que o *M. hyopneumoniae*, possui a capacidade de colonizar diferentes tecidos suínos, além do trato respiratório<sup>46</sup>, evidenciando que este agente não é específico e exclusivo do trato respiratório. Este já foi isolado de fluido pericárdico e cérebro<sup>9</sup> de suínos criados comercialmente, bem como de linfonodos, baço, fígado e rins de animais infectados experimentalmente por via intratraqueal<sup>27,30</sup>. Outros autores<sup>12</sup> verificaram que suínos com lesões de PES tem maior predisposição para desenvolver um quadro de nefrite e puderam estabelecer uma relação entre lesões pulmonares e renais. No entanto não pesquisaram qual

agente etiológico poderia estar presente nestas lesões. Sugeriram ainda que a imunodepressão ocasionada pelo *M. hyopneumoniae*, principal agente envolvido nesta enfermidade, seja também a provável causa da concomitante alteração renal, apesar desta relação entre lesões ser desconhecida. Embora seu DNA tenha sido detectado em nível renal por autores de apenas um estudo<sup>27</sup>, sua presença como possível agente associado às lesões renais inflamatórias (nefrite) não foi investigada e portanto não é conhecida.

Diante dos fatos expostos, o objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar possíveis lesões renais inflamatórias quanto ao aspecto e localização do infiltrado inflamatório e associá-las à presença de *M. hyopneumoniae*, PCV2 e *Leptospira* spp. como agentes etiológicos, a fim de comprovar a associação entre lesões pulmonares de PES e lesões renais com envolvimento do *M. hyopneumoniae*, por sua detecção concomitante com o tecido renal de suínos de terminação abatidos sob inspeção.

### **Material e métodos**

Foram avaliados 100 rins de suínos de terminação, abatidos sob inspeção sanitária oficial durante o mês de fevereiro de 2011 no estado de Santa Catarina, Brasil. Estes animais eram procedentes de 50 granjas diferentes e tinham em média 110 dias de idade e peso médio de 85,16 Kg.

Durante o abate e na ocasião da inspeção *post-mortem*, para se coletar cada rim foi levada em consideração a presença/ausência de lesões pulmonares macroscópicas sugestivas de PES, diagnosticadas por funcionários do serviço de inspeção do estabelecimento. Para isso foram estabelecidos dois grupos, cada um com 50 animais, tratando-se de um estudo epidemiológico do tipo caso-controle. Assim, o grupo caso foi representado por rins

procedentes de suínos diagnosticadas com as referidas lesões, enquanto que o grupo controle foi representado por rins de suínos coletados de animais sem tais lesões pulmonares. Para cada amostra de rim obtido de um animal com lesão pulmonar, era obtida em seguida uma amostra de rim de um animal sem lesão pulmonar, com o cuidado de que este conjunto fosse do mesmo plantel.

Após a coleta, uma parte de cada amostra foi congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  e a outra parte foi conservada em formalina tamponada a 10% e esta última foi processada para a histopatologia, através das técnicas habituais para inclusão em parafina<sup>1</sup> e submetida ao exame histopatológico, a fim de se verificar a presença de lesões renais. Para isto, foram avaliados sob microscopia óptica, os cortes histológicos obtidos a partir de blocos de parafina contendo fragmentos dos respectivos rins analisados, corados pela hematoxilina e eosina. Os rins com lesões inflamatórias microscópicas (nefrite) foram agrupados segundo o aspecto e a localização do referido infiltrado inflamatório e quantificados por meio da estatística descritiva.

Tanto os casos que apresentaram quanto os que não apresentaram lesões renais na microscopia, foram testados quanto à presença de *Leptospira* spp. Para isso, foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), conforme Ellis et al.<sup>19</sup>, a partir de impressões de fragmentos de rim fresco em lâminas para microscopia, as quais estavam congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas foram processadas segundo metodologia descrita por Miller et al.<sup>35</sup>.

A fim de relacionar as lesões renais identificadas na microscopia com a detecção de PCV2 e *M. hyopneumoniae*, foram pesquisados a partir do material congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  a presença destes agentes, por meio da Nested-PCR (N-PCR), que consiste em uma variação da PCR convencional, permitindo uma segunda amplificação do produto da primeira PCR, utilizando “primers” internos específicos, os quais reconhecem a sequência de nucleotídeos da primeira amplificação<sup>6</sup>.

A extração do DNA genômico utilizado na N-PCR foi realizada por meio do Kit DNase Blood & Tissue (Qiagen<sup>®</sup>), segundo as recomendações do fabricante. Para a pesquisa de DNA de *M. hyopneumoniae*, tanto a reação da PCR quanto da N-PCR foram realizadas segundo Yamaguti et al.<sup>47</sup>. Os “primers” externos utilizados foram os previamente descritos por Matsson et al.<sup>33</sup> e os “primers” internos foram aqueles descritos por Calsamiglia et al.<sup>10</sup>. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura pura de *M. hyopneumoniae*. Como controle negativo das reações, utilizou-se água ultrapura.

Para a detecção de DNA de PCV2, a PCR convencional e a N-PCR foram conduzidas usando “primers” previamente descritos por Ellis et al<sup>18</sup> e Kim e Chae<sup>23</sup>. As reações foram realizadas conforme a descrição de Kim et al<sup>25</sup>. Como controle positivo, foi utilizada amostra de PCV2 isolada de suínos com sinais clínicos e lesões de Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS)<sup>15</sup>. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo nas reações.

Os produtos amplificados na N-PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo. A visualização e a fotodocumentação foram realizadas sob luz ultravioleta.

O teste de McNemar foi usado para verificar a associação entre o diagnóstico macroscópico de PES e nefrite; entre lesões de nefrite e presença de *M. hyopneumoniae* e lesões de nefrite e presença de PCV2.

## **Resultados e discussão**

### **Avaliação microscópica**

Após a análise microscópica, dos 100 rins avaliados, 64 apresentaram lesões inflamatórias (nefrite) em diferentes graus de severidade, indicando uma frequência relativa

de 64%, conforme pode ser observado na Tabela 1. O aspecto e a localização do infiltrado inflamatório, levando-se em consideração os rins provenientes de animais com e sem lesões de PES, podem ser verificados na Tabela 1.

Com relação ao aspecto do infiltrado inflamatório mononuclear, o difuso foi o mais frequente (41%), tanto no grupo caso quanto no grupo controle. Em relação à localização do referido infiltrado, o intersticial, considerado isoladamente, foi o mais frequente (40%).

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com aqueles relatados por Carrijo<sup>12</sup>, que também verificou que o infiltrado inflamatório difuso e o intersticial foram o aspecto e a localização mais frequentes no tecido renal, respectivamente.

#### Diagnóstico macroscópico de PES x nefrite

Os resultados da associação das variáveis diagnóstico macroscópico de PES e nefrite encontram-se dispostos na Tabela 2. Pode-se verificar que 72% (36/50) dos animais com lesões pulmonares para PES apresentaram concomitantemente lesão renal e 44% (22/50) apresentaram diagnóstico negativo para as duas situações. Pelo Teste de McNemar, há uma relação significativa ( $p=0,0308$ ) entre estas lesões, comprovando que em indivíduos que possuem lesões de PES há maior predisposição para se estabelecer um quadro de nefrite.

Estes resultados estão de acordo com os que foram apresentados por Carrijo et al.<sup>11</sup>, que também verificaram que animais com diagnóstico microscópico de PES apresentam maior associação a um quadro de nefrite.

#### Presença de *Leptospira* spp.

Quanto à presença da bactéria *Leptospira* spp., todos os tecidos analisados foram negativos após o teste da IFD. Este resultado está de acordo com o que foi encontrado por Oliveira-Filho<sup>37</sup>, que também não detectou a presença deste agente em nível renal, utilizando



a mesma técnica adotada no presente estudo, após ter analisado 400 rins de suínos com lesões macroscópicas de nefrites (rins de “manchas brancas”). Outros autores<sup>31</sup> encontraram apenas duas amostras positivas para este agente através da IFD em 44 rins analisados. Estes resultados reforçam a afirmação de que nem sempre as lesões renais estão associadas a este patógeno, como relatado anteriormente por outros autores<sup>16,31</sup>. Este novo cenário pode estar relacionado às melhores condições de higiene adotadas no manejo e nas instalações, além de práticas de saneamento necessárias na suinocultura tecnificada, proporcionando o controle desta infecção por meio de uma série de medidas, como por exemplo, a prática generalizada de vacinação de animais reprodutores, cuja prole (animais em terminação) recebe anticorpos de forma passiva e o controle de roedores, principal fonte de eliminação da bactéria<sup>2,40,44</sup>. Complementarmente, a adoção de tratamento com antimicrobianos para controle de outras infecções, porém com ação sobre leptospiros, e o curto período de permanência dos animais terminados nas granjas favorecem a manutenção da sanidade dos animais em relação a este agente<sup>16,41</sup>.

#### Presença de *M. hyopneumoniae*

Conforme pode ser observado na Tabela 3, em 96,87% (62/64) dos rins com lesões microscópicas foi detectado o *M. hyopneumoniae*, indicando que há uma associação estatisticamente significativa entre lesões renais e a presença deste agente ( $p < 0,0001$ ).

Muitos autores tem procurado esclarecer quais são os agentes infecciosos possivelmente envolvidos na nefrite intersticial de suínos aparentemente saudáveis na ocasião do abate, mas os resultados tem variado consideravelmente<sup>4,8,13,16,22</sup>. No entanto, embora o DNA do *M. hyopneumoniae* já tenha sido detectado em rins<sup>27</sup>, este microrganismo nunca foi relacionado como um suposto agente causador das alterações inflamatórias nesse sítio.

O presente estudo confirmou que há uma associação significativa entre a presença de lesões inflamatórias renais e a detecção do DNA de *M. hyopneumoniae*, o qual está presente em rins de suínos de terminação (110 dias) na ocasião do abate. Esta é a primeira vez que um trabalho relaciona a presença de *M. hyopneumoniae* como um possível agente etiológico de lesões renais.

A possível rota utilizada pelo *M. hyopneumoniae* para que o mesmo se localize em outros sítios, distintos do trato respiratório não são esclarecidos. Foi sugerido por Le Carrou et al.<sup>27</sup> que essa disseminação para outros locais pode ocorrer pela via linfática (devido a recuperação deste agente a partir dos linfonodos) ou pela via hemática. Foi verificada a presença do DNA deste micoplasma nos macrófagos alveolares e intersticiais<sup>26</sup>. Diante destes achados, não está claro se o *M. hyopneumoniae* realmente infecta estas células ou se a presença de seu DNA é resultado do sistema de defesa natural dos macrófagos, os quais eliminam organismos bacterianos, DNA e seus produtos<sup>28</sup>.

Segundo Le Carrou et al.<sup>27</sup> presença deste microrganismo em órgãos internos provavelmente não está relacionada ao desencadeamento da enfermidade em nível pulmonar. No entanto, no presente trabalho, comprovou-se que há uma associação significante entre animais com lesões pulmonares de PES e alterações inflamatórias renais. Os autores supracitados<sup>27</sup> também verificaram a presença de *M. hyopneumoniae* tanto em rins quanto em outros órgãos internos (baço, fígado e linfonodos) de suínos infectados experimentalmente e naqueles que tiveram contato com portadores deste agente. No entanto estes autores atribuíram pouca importância a este achado, sugerindo que essa disseminação para órgãos internos parece ser transitória, pelo fato de que o DNA do *M. hyopneumoniae* não foi recuperado em todas as coletas realizadas ao longo do estudo, deixando de ser detectados a partir destes órgãos no final do experimento (76 a 80 dias pós inoculação em suínos com três semanas de idade) e foram detectados apenas em linfonodos e no trato respiratório. Outros

micoplasmas com predileção pelo trato respiratório, tais como *M. pneumoniae* em humanos<sup>20,48</sup> e *M. gallisepticum* em aves<sup>36</sup> são capazes de atravessar a barreira mucosa e disseminar pelo organismo do hospedeiro e que portanto são necessários mais estudos para se verificar se o *M. hyopneumoniae* tem a capacidade de invadir células fagocitárias e não fagocitárias.

Apesar de muitos aspectos das alterações imunológicas induzidas nas infecções pelo *M. hyopneumoniae* serem ainda desconhecidos, a resposta inflamatória é vista como o componente mais importante na enfermidade causada por este agente<sup>29</sup>.

#### Presença de PCV2

Na Tabela 4 pode-se verificar que 89,06% (57/64) dos rins com lesão microscópica também foi verificada a presença de PCV2 havendo uma associação significativa ( $p=0,0002$ ) entre as lesões inflamatórias renais e a detecção deste agente. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Drolet et al.<sup>16</sup>, que também verificaram uma associação significativa ( $p=0,0074$ ) entre lesão de nefrite intersticial e presença de PCV2.

O PCV2 foi detectado também pela N-PCR em 30,35% (98/324) rins de suínos de terminação, na ocasião do abate, com alterações histopatológicas provenientes do estado de Mato Grosso, Brasil<sup>37</sup>, percentual este inferior ao encontrado no presente trabalho. No entanto este autor supõe que a detecção deste agente pode ter sido subestimada, pois muitas lesões observadas indicavam um processo crônico, podendo o agente não estar mais presente na lesão.

Embora o tecido renal não seja considerado o órgão alvo da infecção pelo PCV2<sup>42</sup>, exceto nos casos da Síndrome da Dermatite e Nefropatia dos suínos<sup>14</sup>, a alta detecção deste agente comprova que o mesmo está disseminado por todo o rebanho brasileiro<sup>5</sup>, sendo a forma subclínica a mais comum de manifestação, apesar da vacinação dos rebanhos em massa

ter sido adotada como principal medida de controle<sup>49</sup>. Desta forma praticamente não se observa sinais clínicos em animais na inspeção *ante-mortem*, porém o agente continua sendo detectado com facilidade em rins de suínos com lesão.

#### Presença conjunta de PCV2 e *M. hyopneumoniae*

A presença conjunta de PCV2 e *M. hyopneumoniae* foi detectada em 85,94% (55/64) dos rins com lesão, conforme pode ser verificado na Tabela 5. Mesmo diante da verificação da presença destes dois patógenos em um mesmo órgão (rim), apresentados neste estudo, pode-se constatar que as lesões renais foram brandas, embora alguns autores<sup>24,38,39</sup> que detectaram os dois agentes tenham dito que em casos de co-infecção, a gravidade das lesões e a manifestação clínica são aumentadas.

Estudos sobre a investigação da relação entre o *M. hyopneumoniae* e o PCV2 em co-infecções são deficientes, sobretudo nas infecções subclínicas e que são necessários mais estudos<sup>39</sup>. Maes<sup>29</sup> corrobora os autores supracitados, afirmando que a interação entre estes dois patógenos, a nível de campo, refletem apenas de forma parcial a complexidade desta relação.

### Conclusões

O estudo demonstrou que a *Leptospira* spp. não está associada às lesões renais verificadas nos animais analisados, porém o PCV2 e o *M. hyopneumoniae* estão, sendo comprovada a hipótese de que este último agente pode ser detectado no tecido renal de suínos na ocasião do abate, tanto em rins com lesão quanto naqueles sem lesão. No entanto não se sabe se o mesmo pode ocasionar lesões. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre a patogenia renal de *M. hyopneumoniae*. Além disso, é necessário que seja

verificada se a presença conjunta de PCV2 e de *M. hyopneumoniae* é uma associação sinérgica e capaz de provocar lesão

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro; Ao Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPSA/EMBRAPA), em especial ao Dr. Nelson Morés e equipe pelo fornecimento das amostras controle para a Imunohistoquímica; À Dra Janice Reis Ciacci-Zanella e equipe, pelo fornecimento de DNA de PCV2 usado como controle positivo nas reações de PCR; À Dra. Catia Silene Klein e equipe pelo fornecimento do DNA de *M. hyopneumoniae* usado como controle positivo nas reações de PCR; Ao Centro de Diagnóstico em Sanidade Animal (CEDISA) pelo fornecimento das amostras de Leptospiras para os controles positivos.

### **Referencias**

1. Allen TC: 1992, Hematoxilyn and eosin. *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology, ed., pp.53-58. DC, Wasington, USA.
2. Alpers CE, Fogo AB: 2008, O rim e seu sistema coletor. *In: Robbins patologia básica*, ed. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, 8 ed., pp. 591-630. Elsevier, Rio de Janeiro, RJ.

3. Badke MRT. *Leptospirose*. CONGRESSO ABRAVES, Santa Catarina, 2001. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1\\_manoelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1_manoelrenato.pdf)>  
Acesso em: 02 dezembro, 2011.
4. Baker TF, Mcewen SA, Prescott JF, Meek AH: 1989, The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. *Can J Vet Res* 53: 290–294.
5. Barbosa CN, Lobato ZIP, Nascimento EF, Nakajima M, Ristow LE, Cavalcanti JE. Estudo do perfil serológico para o circovirus suíno tipo 2 (CVS-2) em granjas tecnificadas para produção comercial de suínos. In ABRAVES, 12, 2005, Fortaleza, CE. *Anais...* Fortaleza, CE: ABRAVES, 2005. V.II, p.97-98.
6. Blanchard B, Kobisch M, Bové JM et al.: 1996, Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Prob* 10:15–22.
7. Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, et al.: 1992, Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *M. hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30:329–341.
8. Boqvist S, Montgomery JM, Hurst M, et al.: 2003, *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. *Vet Microbiol* 93:361–368.
9. Buttenschon J, Friis NF, Aalbaek B, et al.: 1997, Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. *J Vet Med A* 44:271–280.
10. Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo, A: 1999, Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diag Invest* 11:246-251.
11. Carrijo KF, Nascimento ER, Tortelly R: 2011, Porcine Enzootic pneumonia: relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil. *Biosci J* 27:439-443.

12. Carrijo KF. Pneumonia Enzoótica em suínos de abate: relação entre lesões pulmonares e renais. Niterói, 2007. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.
13. Chappel RJ, Prime RW, Millar BD, et al.: 1992, Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet Microbiol* 30:151–163.
14. Choi C, Kim J, Kang I, Chae C: 2002, Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Vet Rec* 151:484-485.
15. Ciacci-Zanella JR, Morés N: 2003, Diagnóstico f post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). *Arq Bras Med Vet Zoot* 55:522-527.
16. Drolet R, D'allaire S, Laroche R, et al.: 2002, Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *Vet Rec* 150:139-143.
17. Eggen AA, Witvliet M, Schmidt U, Raes M. One-dose vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. 21<sup>st</sup> IPVS Congress. Proceedings... Vancouver, Canada. 2010; p.110.
18. Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, et al.: 1999, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wast-ing syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11:3–14.
19. Ellis W, O'brien J, Neill S, et al.: 1982, Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet Rec* 110:147-150.
20. Garnier JM, Noel G, Retornaz K, et al.: 2005, Extrapulmonary infections due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Arch Pediatr* 1:S2–S6.
21. Hunter P, Van Der Vyver FH, Selmer-Olsen A, et al.: 1987, Leptospirosis as a cause of “white spot” kidneys in South African pig abattoirs. *Onderstepoort J Vet Res* 54:59–62.

22. Jones R, Millar B, Chappel R, Adler B: 1987, Macroscopic kidney lesions in slaughtered pigs are an inadequate indicator of current leptospiral infection. *Aust Vet J* 64:258-9.
23. Kim J, Chae C: 2001, Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *J. Virol Methods* 92:105–111.
24. Kim J, Chung HK, Chae C: 2003, Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary J* 166:222-223.
25. Kim J, Han DU, Choi C, Chae C: 2001, Differentiation of porcine circovirus PCV1 and PCV2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Met* 98:25-31.
26. Kwon D, Chae C: 1999, Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin labeled probe. *Vet Pathol* 36:308-313.
27. Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Biuchardon AV: 2006, Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* Gene. *Antimicrob agents chemother* 50:1959-1966.
28. Maes D. Importance of highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos (ABRAVES), 14, Uberlândia, MG. *Anais: Palestras*. 2009, p. 175-182.
29. Maes D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: update on epidemiology and control. 21<sup>st</sup> IPVS Congress. Proceedings... Vancouver, Canada. 2010; p.30-35.
30. Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV: 2007, Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microb* 120:96–104.



31. Martínez J, Jaro PJ, Aduriz G, et al.: 2007, Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *Vet J* 174:160-164.
32. Martinez J, Segales J, Aduriz G: 2006, Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. *Res Vet Sci* 81:92-98.
33. Mattsson J.G, Bergstrom K, Wallgreen P, Johansson KE: 1995, Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 33:893-897.
34. Michina S, Campbell R: 1969, Leptospirosis in pigs: epidemiology, microbiology and pathology. *Vet Rec* 84:135-138.
35. Miller D A, Wilson MA, Kirkbride CA: 1989, Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J Vet Diagn Invest* 1:146-149.
36. Niluis AM, Shen LL, Hensey-Rudloff D, et al.: 2003, In vitro antibacterial potency and spectrum of ABT-492, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3260-3269.
37. Oliveira Filho JX. Estudo patológico, etiológico e importância econômica de nefrites em suínos abatidos no estado de Mato Grosso. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2010. 59p.  
(Capturado em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp125153.pdf>>).
38. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG: 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19:591–615.
39. Opriessnig T, Thacker EL, Yu S: 2004, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41:624–640.

40. Rende JC, Rigobelo EC, Marin JM, Ávila FA: 2007, Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans* sorovar wolffi: determinação de parâmetros bioquímicos. *Cienc Rural* 37:458-463.
41. Ribotta M, Higgins R, Perron D: 1999, Swine leptospirosis: low risk of exposure for humans? *Can Vet J* 40:809-810.
42. Segalés J, Domingo M: 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24:109-124.
43. Segalés J, Rosell C, Domingo M: 2004, Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98:137-49.
44. Soto FRM, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, et al.: 2007, Artigo de revisão: Leptospirose suína. *Arq Inst Biol* 74:379-395.
45. Tajima M, Yagihashi T: 1982, Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect and Immun* 37:1162-1169.
46. Wilton J, Jenkins C, Cordwell SJ: 2009, Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol* 71:566–582.
47. Yamaguti M, Muller EE, Piffer AI, et al.: 2008, Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. *Braz J Microbiol* 39:471-476.
48. Yavlovich A, Tarshis M, Rottem S: 2004, Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiol Lett* 233:241–246.
49. Young MG, Cunningham GL, Sanford SE: 2011, Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod* 19:175-180.

**Tabela 1.** Achados microscópicos em rins de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011, em um estudo tipo caso-controle.

Achados histopatológicos rins suínos		Grupo caso		Grupo controle		TOTAL	
Infiltrado inflamatório mononuclear		N	%	N	%	N	%
Aspecto	Difuso	21	42	20	40	41	41
	Nodular	15	30	6	12	17	17
	Difuso + Nodular	4	8	2	4	4	6
	S/ inflamação	14	28	22	44	36	36
	TOTAL	50	100	50	100	100	100
Localização	Perivascular	7	14	1	2	8	8
	Intersticial	23	46	17	34	40	40
	Periv + Inter +Perigl	2	4	0	0	2	2
	Perivas + intersticial	4	8	10	20	14	14
	S/ inflamação	14	28	22	44	36	36
	TOTAL	50	100	50	100	100	100
Rins sem lesão		14	28	22	22	44	36
Rins com lesão		36	72	28	78	56	100
TOTAL rins analisados		50	100	50	100	100	100

**Tabela 2.** Relação entre o diagnóstico macroscópico de PES e microscópico de nefrites em suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011, em um estudo tipo caso-controle\*.

Lesão macroscópica	Lesão microscópica renal (nefrite)			
	PES	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos (caso)		36 (72,0)	14 (28,0)	50 (100)
Negativos (controle)		28 (56,0)	22 (44,0)	50 (100)
Total		64 (64,0)	36 (36,0)	100 (100)

\* McNemar significativo (p=0,0308).

**Tabela 3.** Relação entre os diagnósticos microscópicos de lesões renais (nefrite) e PCR para *M. hyopneumoniae* (MY) em rins de suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011\*.

Lesão renal	PCR MY em rins			
	microscópica	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos		62 (96,87)	2 (3,13)	64 (100)
Negativos		34 (94,45)	2 (5,55)	36 (100)
Total		96 (96,0)	4 (4,0)	100 (100)

\*McNemar significativo (p<0,0001).

**Tabela 4.** Relação entre os diagnósticos microscópicos de lesões renais (nefrite) e PCR para PCV2 em rins de suínos abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011\*.

Lesão renal microscópica	PCR PCV2 em rins		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos	57 (89,06)	7 (10,94)	64 (100)
Negativos	29 (80,55)	7 (19,45)	36 (100)
Total	86 (86,0)	14 (14,0)	100 (100)

\*McNemar significativo (p=0,0002).

**Tabela 5.** Relação entre o diagnóstico pela PCR para PCV2 e *M. hyopneumoniae* em rins de suínos com lesão, abatidos sob Inspeção Sanitária no estado de Santa Catarina, Brasil, durante o mês de fevereiro de 2011.

PCV2 (PCR)	<i>M. hyopneumoniae</i> (PCR)		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos	55 (85,937)	2 (3,125)	57 (89,06)
Negativos	7 (10,94)	0 (0,0)	7 (10,94)
Total	62 (96,877)	2 (3,125)	64 (100)

### 3.3 INFLUÊNCIA DO *M. hyopneumoniae* EM SUÍNOS DE ABATE COM LESÕES MICROSCÓPICAS PULMONARES E RENAIIS SOBRE O PESO, ESPESSURA DE GORDURA, RENDIMENTO E PERCENTUAL DE CARNE MAGRA

Enviado para o periódico Ciência Animal Brasileira (Qualis B2).

## **INFLUÊNCIA DO *M. hyopneumoniae* EM SUÍNOS DE ABATE COM LESÕES MICROSCÓPICAS PULMONARES E RENAIIS SOBRE O PESO, ESPESSURA DE GORDURA, RENDIMENTO E PERCENTUAL DE CARNE MAGRA**

KÊNIA DE FÁTIMA CARRIJO<sup>1\*</sup>; ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO<sup>2</sup>; ARLEI COLDEBELLA<sup>3</sup>; NELSON MORÉS<sup>3</sup>; CATIA SILENE KLEIN<sup>3</sup>, LIANA LUMI OGINO<sup>4</sup>, ROGERIO TORTELLY<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup>Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense.

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, SC, Brasil.

<sup>4</sup>Bolsista de Capacitação Técnica FAPERJ, Universidade Federal Fluminense

<sup>5</sup>Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense

\*e-mail: keniacarrijo@famev.ufu.br

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se as variáveis de desempenho: peso, espessura de gordura, rendimento e porcentagem de carne magra de suínos de terminação são influenciados pela presença lesões microscópicas pulmonares, lesões microscópicas renais e *M. hyopneumoniae* detectado pela imunohistoquímica (IHQ). Após o abate de 100 suínos de terminação, foram coletados fragmentos de rim e de pulmões, sendo que destes, 50 possuíam lesões macroscópicas características de PES e 50 não tinham tais lesões. Estes foram acondicionados em frascos contendo formalina tamponada a 10% e submetidos à análise histopatológica. Obteve-se ainda os dados de peso, espessura de gordura, rendimento e porcentagem de carne magra das respectivas carcaças. Pesquisou-se ainda a presença de antígenos de *M. hyopneumoniae* por meio da IHQ. Aplicou-se a análise de variância por meio do procedimento GLM do software SAS. As lesões microscópicas pulmonares influenciaram a espessura de gordura e o percentual de carne magra, porém não influenciaram o peso; as lesões microscópicas renais e a presença de *M. hyopneumoniae* pela IHQ não influenciaram nenhuma das variáveis de desempenho analisadas, possivelmente pelo fato dos animais analisados terem sido vacinados contra este agente etiológico.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, lesões pulmonares, lesões renais, variáveis de desempenho, suínos.

### INFLUENCE OF *M. HYOPNEUMONIAE* IN SLAUGHTER PIGS WITH MICROSCOPIC LUNG AND RENAL LESIONS UNDER WEIGHT, FAT THICKNESS, YIELD AND LEAN PERCENTAGE

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether the performance variables: weight, fat thickness, yield and percentage of lean pigs termination are influenced by the presence of microscopic lung lesions, microscopic lesions and renal *M. hyopneumoniae* detected by immunohistochemistry (IHC). After the slaughter of 100 pigs termination, samples were collected from kidney and lungs, and of these, 50 had gross lesions characteristic of PES and 50 had no such lesions. These were placed in plastic flasks containing 10% buffered formalin and submitted for histopathologic analysis. Obtained even if the data weight, fat thickness, yield, and lean percentage of the respective carcasses. It was also investigated the presence of antigens of *M. hyopneumoniae* by immunohistochemistry (IHC). Applied to analysis of

variance by the GLM procedure of SAS software. The microscopic lung lesions influenced the fat thickness and percentage of lean meat, but did not affect weight, microscopic renal lesions and the presence of *M. hyopneumoniae* by IHC did not influence any of the performance variables analyzed, possibly because of the analyzed animals have been vaccinated against this agent.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, renal lesions, performance variables, swine.

## INTRODUÇÃO

O desempenho animal é o resultado de uma complexa interação de processos biológicos, regulados pela conjunção de fatores genéticos e ambientais (condições térmicas, manejo nutricional e padrão sanitário), os quais irão definir qual a proporção do potencial genético que os animais poderão efetivamente expressar (WILLIAMS, 1998). Dentre as variáveis ambientais, o padrão sanitário é uma das mais decisivas para a otimização deste desempenho. Na ocorrência de doenças infecciosas, os processos inflamatórios desencadeados podem resultar em diminuição no ganho de peso e na eficiência alimentar (VAN HEUTGEN et al., 1994).

Animais doentes não demonstram bom crescimento e desenvolvimento em função do baixo consumo alimentar (DRITZ et al., 1996), resultante da anorexia ocasionada pela ação de citocinas inflamatórias secretadas por macrófagos, os quais tiveram a síntese destes compostos induzida pela ação de determinados patógenos (KELLEY et al., 1993). Além disso, há redução na síntese protéica, prejudicando a deposição de proteína no tecido muscular esquelético, associado à maior taxa de degradação (catabolismo muscular), em função da inibição na síntese de hormônios anabólicos pelo adeno-hipófise. Essas alterações auxiliam na compreensão dos mecanismos pelos quais os animais doentes tem seu desempenho negativamente aumentado (WEBEL et al., 1997).

Dentro deste contexto, a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), associada ao *M. hyopneumoniae*, é uma doença respiratória crônica que resulta em infecções combinadas com um ou mais patógenos secundários (THACKER, 2006), ocasionando aumento nos custos de medicação, redução das taxas de crescimento e conversão alimentar, além da conseqüente depreciação das carcaças no frigorífico (MAES et al., 1996; MAES, 2010; ROSS, 1999). Após se instalar, este agente é capaz de suprimir as atividades de fagocitose do macrófago alveolar, principal célula de defesa do trato respiratório contra agentes infecciosos, desencadeando um processo de imunossupressão no hospedeiro (THANAWONGNUWECH



et al., 2004), o que contribui para que infecções secundárias ocorram em nível pulmonar. Além das lesões pulmonares que ocasiona, CARRIJO et al. (2011) verificaram que suínos com lesões de PES tem maior predisposição para desenvolver um quadro de lesões renais (nefrite). Complementarmente, CARRIJO (2007) constatou que a presença desta inflamação em nível renal interfere negativamente no peso, de forma que um animal portador da referida inflamação apresenta peso menor em relação a um animal com diagnóstico negativo para esta lesão.

Baseado nestes fatos, o objetivo do presente estudo foi verificar se as variáveis de desempenho: peso, espessura de gordura, rendimento e porcentagem de carne magra de suínos de terminação são influenciados pela presença lesões microscópicas pulmonares, lesões microscópicas renais e *M. hyopneumoniae* detectado pela imunohistoquímica (IHQ).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem do material e coleta das amostras

Para esta pesquisa foram obtidas amostras de tecidos de 100 suínos com idade média de 110 dias, abatidos sob inspeção sanitária no estado de Santa Catarina durante o mês de fevereiro de 2011, oriundos de 50 granjas localizadas em 31 municípios diferentes.

Após o abate e a realização dos exames que constituem a inspeção *post-mortem* dos animais nas linhas de inspeção no frigorífico, foram separados de um mesmo animal o conjunto traquéia-pulmões e um dos rins, já destacados da gordura perirrenal. O critério adotado para realizar a coleta do pulmão foi a verificação de presença/ausência de lesões macroscópicas sugestivas de PES. Foram estabelecidos dois grupos, cada um com 50 pulmões com as referidas lesões e 50 sem tais lesões. De cada lote de suínos, após a obtenção de um fragmento de pulmão com lesão, era recolhido em seguida um fragmento de pulmão sem tais lesões de outro animal, bem como um dos rins de suas respectivas carcaças. Os fragmentos de pulmão e rim coletados foram então acondicionados em frascos contendo formalina tamponada a 10% para posterior processamento histológico.

As respectivas carcaças dos animais selecionados foram identificadas, imediatamente após a coleta dos órgãos, para que pudessem ser obtidos posteriormente na seção de tipificação, seus respectivos dados de peso, espessura de gordura (mm), rendimento de carne magra (CM/kg) e porcentagem de carne magra (CM porcentagem), por meio do uso de pistola eletrônica de tipificação Hennessy Grading Probe<sup>®</sup>, modelo GP4, tomada entre a última

vértebra lombar e a primeira vértebra sacral (BRASIL, 1981). Após a obtenção dos dados, estes foram digitados no banco de dados para serem posteriormente analisados.

Processamento histológico e Imunohistoquímica para detecção de antígenos de *M. hyopneumoniae*

Os tecidos pulmonar e renal foram processados segundo o método usual de rotina de inclusão em parafina (ALLEN, 1992). Para isso, as amostras fixadas em formalina tamponada a 10% foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Posteriormente foram submetidas a três banhos em parafina e incluídas em blocos. Estes foram seccionados a 4µm em micrótomo. Para a coloração por Hematoxilina e eosina, os cortes histológicos de pulmão e rim foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de álcool, corados e posteriormente visualizados em microscópio óptico.

Com relação ao tecido renal, durante a leitura, verificou-se a presença de lesões microscópicas inflamatórias, sendo considerados como positivos aqueles rins portadores de tais lesões e negativos aqueles que não tinham as referidas lesões. Quanto ao tecido pulmonar, adotou-se os critérios de classificação por escore de lesão descritos por VAN ALSTINE et al. (1996), IRIGOYEN et al. (1998) e SCOFANO (2006). A reação peribronquial foi graduada como escore zero quando não eram observados nódulos peribronquiais de constituição mononuclear, indicando ausência de lesão; escore um quando pequenos nódulos estavam presentes em menos de 25% dos brônquios, bronquíolos e vasos; escore dois quando pequenos nódulos estavam presentes em 25-75% dessas estruturas e escore três quando estavam presentes em mais de 75% das estruturas ou devido à presença de grandes nódulos. Foram considerados como negativos, os pulmões com escores microscópicos zero e um e positivos os que apresentaram escore microscópico dois e três.

Os cortes histológicos de pulmão, destinados à IHQ para a detecção de antígenos de *M. hyopneumoniae* foram colocados sobre lâminas para microscopia revestidas com poly-L-lisina (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA) e posteriormente foram tratados e corados segundo a técnica proposta por GAVA et al. (2008). Como controle positivo foram utilizados cortes de pulmões de suínos livres de patógenos específicos (SPF) inoculados experimentalmente com este microrganismo e com diagnóstico confirmado pela Nested-PCR (N-PCR). Como controle negativo foram utilizados cortes de pulmões de animais SPF,

também testados pela N-PCR. Tais controles foram gentilmente cedidos pelo Dr. Nelson Morés, Laboratório de Patologia, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

Os cortes foram desparafinados em xilol e reidratados em soluções de álcool decrescentes. A recuperação antigênica foi realizada submergindo-se as lâminas em tampão citrato e posteriormente aquecidas em microondas em duas etapas de 5 minutos cada. A seguir, os tecidos foram cobertos com solução de pepsina 0,04% diluída em ácido clorídrico 0,01N e incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C por 10 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante cinco minutos. Para o bloqueio das reações inespecíficas, utilizou-se a solução de bloqueio “Serum Blocking Solution” do Kit Histostain-sp – HRP 1000S (Life Technology/Invitrogen®), incubando-se as lâminas em câmara úmida por 30 minutos. Posteriormente, os tecidos pulmonares foram cobertos com anticorpo policlonal monoespecífico contra a proteína recombinante p36 do *M. hyopneumoniae*, produzido e cedido pelo Programa de Investigação de Genomas Sul – PIGS, na diluição de 1:2400 e incubados por 2 horas em câmara úmida em estufa a 37°C.

A seguir estes tecidos foram cobertos e incubados por 10 minutos em câmara úmida em estufa a 37°C com o anticorpo secundário biotilado (“Biotinylated Second Antibody”) e à seguir, pelo conjugado enzimático (“HRP Streptavidin”), sendo os tecidos incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, ambos pertencentes ao Kit Histostain-sp – HRP 1000S (Life Technology/Invitrogen®).

A revelação da reação foi realizada com a solução reveladora de AEC (3-amino 9-ethyl-carbazole-hydrogen peroxide substrate) por cinco minutos em estufa a 37°C. Posteriormente as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer por dois minutos e logo em seguida procedeu-se a montagem das lâminas, pingando-se uma gota de gelatina-glicerol a 42°C e as mesmas foram examinadas ao microscópio óptico.

Para a verificação da presença de antígeno de *M. hyopneumoniae*, adotou-se a metodologia descrita por LORENZO et al. (2006), que estabelecem o resultado como negativo, quando nenhum sinal foi detectado (escore zero) e positivo (escores que variam de um a três). O escore um indica uma fraca quantidade de antígeno no epitélio ciliado de pelo menos um brônquio/bronquíolo; escore dois, moderada quantidade de antígeno na superfície de um pequeno número de brônquios/bronquíolos e três, quando há uma grande quantidade de antígeno na superfície de muitos brônquios e bronquíolos.

## Análise estatística

Para avaliar o efeito da presença de lesões microscópicas de PES em pulmão, lesões microscópicas em rim e presença de *M. hyopneumoniae* diagnosticado pela IHQ sobre peso, espessura de gordura (mm de gordura), rendimento de carne magra (CM kg rendimento) e porcentagem de carne magra (CM Porcentagem) foi aplicada a análise de variância. Essa análise foi realizada através do procedimento GLM do software SAS (2008). Como suporte estatístico foi ainda utilizada a metodologia descrita por THRUSFIELD (2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Associação da presença das lesões microscópicas pulmonares sobre as variáveis de desempenho: peso, espessura de gordura (mm de gordura) e rendimento de carne magra (CM kg rendimento) e porcentagem de carne magra (CM porcentagem)

Após a análise dos cortes histológicos de pulmão, verificou-se que 100% (50/50) daqueles que apresentaram lesões sugestivas de PES foram também positivos na histopatologia. Dentre aqueles sem tais lesões, 94% (47/50) foram negativos para esta enfermidade.

Com relação aos escores de lesão, dos 50 animais considerados como positivos na macroscopia, 22 (44%) foram classificados como escore três na microscopia, 23 (46%) como escore dois, 3 (6%) como escore um e 2 (4%) como escore zero, que representa ausência de lesão. Dentre os animais considerados negativos na macroscopia, 37 (74%) apresentaram escore zero, 10 (20%) escore um, 2 (4%) escore dois e um (2%) escore 3. Ao todo, foram considerados como resultados positivos (escores dois e três) para PES 48% (48/100) e negativos (escores zero e um), 52% (52/100) (dados não publicados).

Na tabela 1 é apresentada a média e o erro padrão de algumas variáveis de desempenho em função da presença ou não de lesões microscópicas de pulmão. Nota-se que animais positivos para lesões microscópicas de pulmão tiveram menor espessura de gordura (mm de gordura) e conseqüentemente maior percentual de carne magra do que os negativos para essa lesão. A diferença de peso entre animais positivos, quando comparada aos negativos não foi significativa.

Tabela 1 - Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho em função da presença ou não de lesões microscópicas de pulmão de suínos de abate.

Variável	Lesões microscópicas de pulmão		Prob>F
	negativo	positivo	
CM kg rendimento	48,87±0,85	49,79±0,88	0,3843
CM porcentagem	56,72±0,47	56,26±0,43	0,0193
Peso	85,88±1,52	84,72±1,50	0,7585
mm de gordura	17,76±0,72	15,53±0,52	0,0172

Estes resultados estão parcialmente de acordo com aqueles apresentados por CARRIJO (2007), que também verificou que as lesões pulmonares não afetaram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o peso individual. No entanto, este autor verificou que a espessura de gordura e o rendimento de carne magra também não foram afetados, discordando com aqueles apresentados no presente estudo. Scofano (2006) verificou uma perda de peso justificada em 7% ( $p < 0,05$ ) em função da lesão pulmonar, fato que não foi constatado no presente trabalho.

O fato de não ter sido verificada influência no peso, embora inúmeros autores (CHOI et al., 2006; DEE, 1997; LORENZO et al., 2006; SCOFANO, 2006) tenham relacionado que animais que apresentam lesão pulmonar de PES tem esta variável de desempenho prejudicada, pode ser justificado por alguns fatores. Dentre eles, deve-se levar em consideração o fato de que nos tempos atuais, a vacinação contra o *M. hyopneumoniae* tem sido largamente usada na indústria suína para aumentar o desempenho dos suínos (BAK & NÖRREGARD, 2010). E dentre os animais analisados no presente estudo, 86% (86/100) eram vacinados para *M. hyopneumoniae*, segundo informação obtida a partir do Boletim Sanitário de acompanhamento do lote dos suínos (BRASIL, 2009), cedidos pela direção do estabelecimento onde foi realizado o abate dos animais (dados não publicados). Embora a vacinação não impeça a colonização deste agente (HAESEBROUCK et al., 2004), essa tem como vantagem, uma melhoria no ganho de peso diário (2-8%) e na taxa de conversão alimentar, além de reduzir os sinais clínicos e lesões pulmonares, diminuindo a mortalidade e melhorando a qualidade das carcaças (MAES et al., 1998; MAES et al.; 1999).

Outro fator que deve ser considerado é o tamanho da amostragem utilizada no estudo. É uma amostragem relativamente pequena, porém representativa do ponto de vista epidemiológico, uma vez que foi possível analisar animais provenientes de 50 propriedades localizadas em 31 municípios diferentes, englobando diferentes manejos e condições sanitárias distintas. Apesar desta referida representatividade, caso o número de lotes

analisados fosse maior, talvez fosse possível verificar tal diferença de peso e demais variáveis de desempenho entre animais com lesões e animais sem tais lesões.

Associação da presença das lesões microscópicas renais sobre as variáveis de desempenho: peso, espessura de gordura e rendimento de carne magra

Após a análise histopatológica, verificou-se que 64% (64/100) dos rins avaliados possuíam lesões inflamatórias. Além disso, 72% dos animais com lesões pulmonares sugestivas de PES apresentaram concomitantemente lesão renal ( $p < 0,05$ ). Conforme pode ser observado na tabela 2, por meio da análise de variância, nota-se que não houve diferença nas variáveis de desempenho analisadas quando se compararam animais positivos com animais negativos para estas lesões.

Estes resultados discordam daqueles que foram relatados por CARRIJO (2007), que verificou que estas lesões microscópicas neste órgão interferem no peso, de forma que um animal portador de tais lesões apresenta menor peso em relação a um animal com diagnóstico microscópico negativo para esta alteração, justificando esta diferença de peso em 5,7% ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2 - Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho em função da presença ou não de lesões microscópicas de rim de suínos.

Variável	Lesões microscópicas de rim		Prob>F
	negativo	positivo	
CM Kg rendimento	49,40±1,06	49,71±0,90	0,3357
CM porcentagem	56,78±0,66	57,65±0,51	0,0591
Peso	87,10±1,82	85,94±1,72	0,8231
mm de gordura	17,81±1,00	16,86±0,68	0,1201

Efeito da presença de *M. hyopneumoniae* em pulmões diagnosticado pela IHQ sobre as variáveis de desempenho: peso, espessura de gordura, rendimento e percentual de carne magra

Após a análise dos cortes de pulmão tratados e corados pela técnica de IHQ, verificou-se que 82% (41/50) daqueles que apresentaram lesões sugestivas de PES foram também

positivos para *M. hyopneumoniae* por esta técnica. Dentre aqueles sem tais lesões, 92% (46/50) foram negativos para este agente. Ao total, 55% (55/100) dos pulmões analisados apresentaram-se negativos para este agente, enquanto que 45% (45/100) foram positivos (dados não publicados).

Pela análise de variância (tabela 3) pode-se verificar que a presença ou não deste agente etiológico não interferiu em nenhuma das variáveis de desempenho analisadas.

MACHADO & FONTES (2004) comentam que frequentemente em infecções experimentais puras, a PES atribuída ao *M. hyopneumoniae*, tem um efeito mínimo no desempenho dos suínos, fato este que em infecções naturais (em nível de campo) dificilmente ocorre. Quando associado a outros agentes infecciosos, resultam em severa diminuição da eficiência de ganhos diários e de alimentação, impedindo o desenvolvimento normal dos suínos. No entanto, conforme mencionado anteriormente, o fato da maioria dos suínos analisados terem sido vacinados contra o *M. hyopneumoniae* (86%), não foi verificada uma diferença significativa nas variáveis analisadas, uma vez que a vacina minimiza a manifestação clínica da enfermidade, fornece boa proteção contra o desenvolvimento de lesões e melhoram significativamente o ganho médio diário em relação aos não vacinados (JENSEN et al., 2002).

Tabela 3 - Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho em função da presença ou não de *M. hyopneumoniae* diagnosticado pela IHQ em pulmões de suínos de abate.

Variável	<i>M. hyopneumoniae</i> pela IHQ		Prob>F
	negativo	positivo	
CM Kg rendimento	49,02±0,85	49,58±0,93	0,3917
CM porcentagem	56,59±0,66	58,20±0,47	0,0835
Peso	85,99±1,55	84,73±1,65	0,9155
mm de gordura	17,92±0,74	15,56±0,58	0,0530

## CONCLUSÕES

Nos suínos analisados, a presença de lesões microscópicas pulmonares se associaram à espessura de gordura e ao percentual de carne magra, porém não se associaram ao peso; as lesões microscópicas renais e a presença de *M. hyopneumoniae* pela IHQ não se associaram a nenhuma das variáveis de desempenho analisadas, possivelmente pelo fato dos animais analisados terem sido vacinados contra este agente etiológico.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro; Ao Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPQA/EMBRAPA), em especial ao Dr. Nelson Morés e equipe pelo fornecimento das amostras controle para a Imunohistoquímica; Aos pesquisadores do Projeto de Investigação de Genomas Sul – PIGS pelo fornecimento do anticorpo policlonal mono específico contra a proteína recombinante p36 do *M. hyopneumoniae*.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, T.C. Hematoxilyn and eosin. **Laboratory Methods in Histotechnology**. American Registry of Pathology. Wasington, D.C, USA, 1992. p.53-58.

BAK, H.; NÖRREGARD, E. Increased performance after combined Mycoplasma and PCV2 vaccination. In: IPVS Congress, 21<sup>st</sup>, 2010, Vancouver, Canada. **Proceedings....** Vancouver, 2010; p.140. Disponível em: < <http://www.pigprogress.net/ipvs-2010/proceedings>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados de Suínos. Ofício Circular CGI/DIPOA nº5, de 27 de março de 2009. Divisão de Inspeção de Carne Suína (DICS). Coordenação Geral de Inspeção (CGI). Departamento de Produtos de Origem Animal (DIPOA). SUÍNOS – Boletim Sanitário – Informações de campo (cadeia produtiva) para suínos enviados ao abate (versão preliminar).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.221, de 22 de setembro de 1981. Aprova o sistema de tipificação de carcaça suína. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 24 set. 1981.

CARRIJO, K.F.; NASCIMENTO, E.R.; TORTELLY, R. Porcine Enzootic pneumonia: relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil. **Bioscience Journal**, v.27, n.3, p. 439-443, 2011.

CARRIJO, K.F. **Pneumonia Enzoótica em suínos de abate: relação entre lesões pulmonares e renais**. Niterói, 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. Disponível em: <[www.uff.br/higiene\\_veterinaria/teses/kenia\\_carrijo.pdf](http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/kenia_carrijo.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2011.



CHOI, C.; KWON, D.; JUNG, D.; HA, Y.; LEE, Y.K.; KIM, O; PARK; H.K.; KIM, S.H.; HWANG, K.K. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.40-46, 2006.

DRITZ, S.S.; OWEN, K.Q.; GOODBAND, R.D; NELSEN, J.L.; TOKACH, M.D.;CHENGAPPA, M.M.; BLECHA, F. Influence of lipopolysaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute phase protein production in segregated early-weaned pigs. **Journal Animal Science**, v.74, p.1620-1628, 1996.

GAVA, D.; CASTRO, L. A.; OLIVEIRA, S. R.; MORÉS, N. Avaliação de diferentes formas de recuperação antigênica na técnica de imunohistoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmões de suínos. In: FÓRUM INTERNACIONAL DA SUINOCULTURA, 4., 2008, Curitiba. Trabalhos técnicos. **Anais...** Concórdia:Embrapa Suínos e Aves, 2008. p.56-57. CD-ROM. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/pneumonia-enzoologica-suina-t172/165-p0.htm>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

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

IRIGOYEN, L.F.; ALSTINE, W.V.; TUREK, J. CLARK, L.K. Ultrastructural observation of the airways of recovered and susceptible pigs after inoculation with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1998.

JENSEN, C.S.; ERSBOLL, A.K.; NIELSEN, J.P. A meta-analysis comparing the effect vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v.54, n.3, p.265-278, 2002.

KELLEY, K.W.; KENT, S.; DANTZER, R. Why sick animals don't grow: an immunological explanation. In: HOLLS, G.R. (Ed). **Growth of the Pig**. CAB International, Wallingford, 1993. p.119-132.

LORENZO H., QUESADA O., ASSUNÇÃO P., CASTRO A.; RODRÍGUEZ F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.199-207, 2006.

MACHADO, G.S.; FONTES, D.A. Interações entre sanidade, ativação imunológica e nutrição de suínos. In: II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2004, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. **Anais...** Foz do Iguaçu, out. 2004. p.61-68. Disponível em: <[http://www.porkworld.com.br/artigos/post/interacoes-entre-sanidade-ativacao-imunologica-e-nutricao-de-suinos\\_10130](http://www.porkworld.com.br/artigos/post/interacoes-entre-sanidade-ativacao-imunologica-e-nutricao-de-suinos_10130)>. Acesso em: 07 jan. 2012.

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; KRUIF, A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in herds with a continuous production system. **Journal Veterinary Medicine B**, v.45, p.495-505, 1998.

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

MAES, D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: update on epidemiology and control. 21<sup>st</sup> IPVS Congress. Proceedings... Vancouver, Canada. 2010; p.30-35. Disponível em: <<http://www.pigprogress.net/ipvs-2010/proceedings>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (Org.). **Diseases of swine**. 8<sup>th</sup> ed. Ames Iowa, Iowa State University, 1999. p.495-510.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.2, Cary, NC, USA, 2002-2008. CD-ROM.

SCOFANO, A.S. **Pneumonia Enzoótica suína: diagnóstico anátomo-patológico, prevalência e efeitos sobre o desenvolvimento da carcaça**. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. Disponível em: <[http://www.uff.br/higiene\\_veterinaria/teses/agostinho\\_sergio\\_completa\\_mestrado.pdf](http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/agostinho_sergio_completa_mestrado.pdf)>. Acesso em: 07 jan. 2012.

THACKER, E. Mycoplasmal disease. In: **Diseases of Swine**, 9<sup>th</sup> edition. STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S. TAYLOR, D.J. (editors). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp.701-17. 2006.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B.; HALBUR, P.; THACKER, E.L. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 11, n. 5, p. 901-908, set. 2004.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2 ed. Roca, São Paulo, SP, 2004. p. 596.

VAN ALSTINE, W.G.; STEVENSON, G.W.; KANITZ, C.L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 49, p. 297-303, 1996.

VAN HEUTGEN, E.; SPEARS, J.W.; COFFEY, M.T. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. **Journal Animal Science**, v.72, p.2661-2669, 1994.

WEBEL, D.M.; FINCK, B.N.; BAKER, D.H.; JOHNSON, R.W. Time course of increased plasma cytokines, cortisol and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1514-1520, 1997.

WILLIAMS, N.H. Impact of immune system activation on pig growth and amino acid needs. In: WISEMAN, J.; VARLEY, M.A.; CHADWICK, J.P. (Ed). **Progress in Pig Science**. Nottingham: University Press, 1998, p.583-588.

3.4 *Leptospira* SPP. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA: POTENCIAL RISCO DE TRANSMISSÃO A TRABALHADORES DE MATADOURO FRIGORIFICO

Aceito para publicação na Revista Brasileira de Medicina Veterinária (Qualis B1)

***Leptospira* SPP. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA: POTENCIAL RISCO DE TRANSMISSÃO A TRABALHADORES DE MATADOURO FRIGORÍFICO**

*Leptospira* SPP. IN KIDNEYS OF PIGS SLAUGHTERED UNDER SANITARY INSPECTION: POTENTIAL RISK OF TRANSMISSION OF WORKERS SLAUGHTERHOUSES

Kênia de Fátima Carrijo<sup>1</sup>; Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>2</sup>; Nelson Morés<sup>3</sup>; Marcos Antônio Zanella Morés<sup>3</sup>; Laerte Pereira de Almeida<sup>4</sup>; Rogerio Tortelly<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** Carrijo K.F., Nascimento E.R., Morés N., Morés M.A.Z., Almeida L.P. & Tortelly R. [***Leptospira* spp. in kidneys of pigs slaughtered under sanitary inspection: potential risk of transmission of workers slaughterhouses**]. *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos sob inspeção sanitária: potencial risco de transmissão a trabalhadores de matadouro frigorífico. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, XX(X):XX-XX, XXXX. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720, Bloco 2T, Jardim Umuarama, Uberlândia-MG. CEP: 38400-902. E-mail: [keniacarrijo@famev.ufu.br](mailto:keniacarrijo@famev.ufu.br)

This study aimed to investigate the presence of *Leptospira* spp. in kidneys of pigs slaughtered under sanitary inspection, to verify their potential risk of transmission to slaughterhouse workers who handle them. We evaluated 100 kidneys from pigs coming from 50 different farms, slaughtered under sanitary inspection in the state of Santa Catarina, Brazil. None of these animals showed clinical signs consistent with leptospirosis at the time of the *ante-mortem* inspection. We did not detect any sample positive for the bacterium *Leptospira* spp. by direct immunofluorescence, although 64 (64%) of the kidneys analyzed showed microscopic inflammatory changes (nephritis) after histopathological evaluation. Although has not been found positive samples for *Leptospira* spp. is of fundamental importance to constant monitoring of the etiologic agent, because of its zoonotic potential, which endangers the health of workers in pigs slaughterhouses.

**KEY WORDS:** *Leptospira*, sanitary inspection, kidneys.

<sup>1</sup>Médica Veterinária, MSc. Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Av. Pará, 1720, Bloco 2T, Jardim Umuarama, Uberlândia-MG. CEP: 38400-902. E-mail: [keniacarrijo@famev.ufu.br](mailto:keniacarrijo@famev.ufu.br)

<sup>2</sup>Médico Veterinário, PhD. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF). Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói-RJ. CEP: 24.230-340. E-mail: [elmiro@vm.uff.br](mailto:elmiro@vm.uff.br)

<sup>3</sup>Médicos Veterinários, MSc. Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – CNPSA-EMBRAPA. BR 153, Km 110, Distrito de Tamanduá, Caixa Postal 21, CEP: 89.700-000, Concórdia-SC. E-mail: [mores@cnpa.embrapa.br](mailto:mores@cnpa.embrapa.br); [marcos.mores@cnpa.embrapa.br](mailto:marcos.mores@cnpa.embrapa.br)

<sup>4</sup>Médico Veterinário, DSc. FAMEV, UFU. Av. Pará, 1720, Bloco 2T, Jardim Umuarama, Uberlândia-MG. CEP: 38400-902. E-mail: [laerte@umuarama.ufu.br](mailto:laerte@umuarama.ufu.br)

<sup>5</sup>Médico Veterinário, DSc. Departamento de Patologia e Clínica Veterinária. Faculdade de Veterinária, UFF. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói-RJ. CEP: 24.230-340. E-mail: [rtortelly@hotmail.com](mailto:rtortelly@hotmail.com)

**RESUMO.** Este trabalho objetivou pesquisar a presença de *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos sob inspeção sanitária, a fim de verificar seu potencial risco de transmissão a trabalhadores de matadouro frigorífico que os manipulam. Foram avaliados 100 rins de suínos, procedentes de 50 granjas diferentes, abatidos sob Inspeção Sanitária, no estado de Santa Catarina. Nenhum dos animais apresentava sinais clínicos compatíveis com a leptospirose na ocasião da inspeção *ante-mortem*. Não foi detectada nenhuma amostra positiva para a bactéria *Leptospira* spp. pela técnica de Imunofluorescência Direta, embora 64 (64%) dos rins analisados apresentassem alterações inflamatórias microscópicas (nefrites) após avaliação histopatológica. Mesmo não tendo sido encontradas amostras positivas para *Leptospira* spp., é de fundamental importância o constante monitoramento deste agente etiológico, em função de seu potencial zoonótico, que coloca em risco a saúde dos trabalhadores de matadouros frigoríficos de suínos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leptospira, inspeção sanitária, rins.

## INTRODUÇÃO

A leptospirose, enfermidade causada por bactérias patogênicas da espécie *Leptospira interrogans* é uma zoonose de grande importância do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário em nível mundial, causando graves problemas tanto para os animais quanto para o ser humano (Faine et al. 1999, Blaha 1989, Perry & Hardy 2000). Os animais são considerados hospedeiros primários importantes para a persistência dos focos de infecção e o homem, hospedeiro acidental e terminal, sendo pouco eficiente na perpetuação da doença (Badke 2001).

Em suínos, a forma aguda da leptospirose ocorre principalmente de forma subclínica, podendo passar despercebida na granja. A forma crônica é caracterizada pela ocorrência de abortamento no terço final da gestação, repetição de cio, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de leitões fracos, baixo número de leitões, descarga vulvar e morte embrionária (Ellis 1992). A eliminação de leptospiras na urina é o fator mais importante na epidemiologia da leptospirose em suínos. A urina de um suíno infectado pode eliminar grande quantidade de leptospiras entre 30 e 60 dias após a infecção (Sobestiansky & Barcellos 2007). Os sorovares mais comumente encontrados, infectando e causando a doença nesta espécie são: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Canicola, Gryppotyphosa, Bratislava e Muenchen (Sobestiansky et al. 1999).

Além do prejuízo econômico ocasionado em virtude da infecção aos animais, a leptospirose é considerada uma doença de risco ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais, como trabalhadores em arrozais e canaviais, minas,

matadouros frigoríficos e saneamento, além de tratadores de animais. Essas atividades geralmente são executadas na ausência de recursos tecnológicos e de equipamentos de segurança, por mão-de-obra desqualificada e mal remunerada, o que aumenta ainda mais o risco da infecção ser contraída (Almeida et al. 1994). Desta forma, funcionários que trabalham diretamente no abate de suínos tem risco ocupacional de adquirirem a leptospirose suína (Bastos 2006, Mérien & Artharid 2005), por estarem expostos ao seu agente etiológico enquanto manipulam rins de animais recém abatidos, muitas das vezes sem luvas, sendo este fato de grande relevância para a saúde coletiva. Tendo em vista o potencial risco à saúde destes trabalhadores, este trabalho objetivou pesquisar a presença de *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos sob inspeção sanitária, a fim de verificar sua potencial risco de transmissão a trabalhadores de matadouro frigorífico que os manipulam.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram avaliados 100 rins de suínos, procedentes de 50 granjas diferentes (dois animais por granja), abatidos em um estabelecimento sob Serviço de Inspeção Federal, no estado de Santa Catarina, durante o mês de fevereiro de 2011. A escolha dos animais foi aleatória, sem discriminação de sexo, raça e idade. Também foi aleatória a escolha do rim colhido de cada animal, sem preferência quanto à posição do órgão, se direita ou esquerda. Nenhum dos animais apresentava sinais clínicos compatíveis com a leptospirose, na ocasião da inspeção *ante-mortem*.

Após a coleta de cada rim na linha de inspeção, foi realizada a impressão de um fragmento com cerca de 0,5 a 1 cm, abrangendo tanto a região medular quanto a cortical, em lâminas para microscopia, as quais foram secas em temperatura ambiente, segundo metodologia descrita por Miller et al. (1989). Posteriormente, as mesmas foram fixadas em Acetona P.A por 10 minutos, secas em temperatura ambiente e estocadas a -20°C. Armazenadas sob refrigeração em caixas de polímero expandido contendo gelo, as lâminas foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Patologia Animal do Complexo de Sanidade e Genética Animal do Centro de Pesquisa em Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Para o diagnóstico de leptospirose, foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), conforme descrita por Ellis et al. (1982), no qual utiliza-se anticorpos multivalentes (NVLS, Ames, IA, USA) preparados em coelhos e

conjugados com isotiocianato de fluoresceína. Tal técnica é constituída das seguintes etapas:

1. Aplicação de cerca de 25 µl de conjugado anti-leptospira sp em uma diluição de 1:2500, deixando-o em câmara úmida a 37°C por 30 minutos;
2. Lavagem das lâminas com água destilada rapidamente;
3. Segunda lavagem em Tampão Fosfato Salino (PBS) por 15 minutos em agitador orbital;
4. Contra coloração com Preto de Eriocromo (1 grama de preto de eriocromo em 59 mL de água destilada – 1:60) por 10 a 20 segundos;
5. Lavagem em água destilada;
6. Montagem de lâmina-lamínula com solução de glicerina tamponada sobre o tecido fixado e contracorado;
7. Leitura das lâminas em microscópio de epifluorescência, onde se observa a leptospira com fluorescência forte e de formas típicas.

Como controle positivo da reação, foi utilizado esfregaço de culturas puras de *Leptospira interrogans* sorovares Canicola (maior tamanho celular) e Icterohaemorrhagiae (menor tamanho celular), fixados em chama (calor) e Acetona P.A. Como controle negativo foi utilizado esfregaço de cultura pura de *Escherichia coli*, fixado igualmente ao controle positivo. Tais culturas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (CEDISA), de Concórdia-SC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi detectada nenhuma amostra positiva para a bactéria *Leptospira* spp. pela técnica de IFD, embora 64 (64%) dos rins analisados apresentassem alterações inflamatórias microscópicas (nefrites) após avaliação histopatológica (dados não publicados). Martinez et al. (2006) encontrou duas amostras positivas para *Leptospira* spp. em 44 amostras analisadas, utilizando a mesma técnica adotada no presente estudo. O diagnóstico laboratorial da leptospirose suína pode ser realizado por diferentes métodos na detecção direta ou indireta do agente ou do seu material genético (Faine et al. 1999, Santa Rosa et al. 1970). A escolha da técnica adotada no presente trabalho foi norteadas, levando-se em consideração, as vantagens que esta apresenta. A demonstração de leptospirose com IFD utilizando anticorpos multivalentes fornece evidências definitivas de que houve uma infecção, ou seja,



demonstra a presença do agente no tecido (Miller et al. 1989). Este fato é particularmente importante, quando se leva em consideração a epidemiologia da leptospirose. As leptospiras podem penetrar ativamente no organismo através das mucosas (ocular e nasofaríngea, por exemplo), da pele íntegra (imersa em água) ou da pele com solução de continuidade (Levett 2001, Riet-Correa et al. 2007). Após a penetração, estas se disseminam rapidamente por via sanguínea ou linfática (Badke 2001, Genovez 2007).

Uma vez presente nos tecidos, durante a manipulação para a execução dos exames que constituem a inspeção *post-mortem* (palpação e cortes do parênquima), os agentes de inspeção e os inspetores de carne podem se infectar, estando em risco a saúde destes trabalhadores (Baker et al. 1989).

Dentre as outras vantagens que a técnica adotada apresenta pode-se citar que sua metodologia apresenta rapidez, permitindo a execução imediata da técnica, é menos onerosa, além de permitir identificar diferentes sorovares (Miller et al. 1989). Adicionalmente, este método não sofre interferência quanto ao seu diagnóstico, como ocorre com outras técnicas, como a Soromicroaglutinação (SAM), preconizada como metodologia de referência pela Organização Mundial de Saúde (Faine et al. 1999). A interpretação desta última técnica é complexa devido às reações cruzadas que acontecem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (Faine 1994, Rentko et al. 1992, Mérien & Artharid 2005), além de haver a interferência no diagnóstico com o uso de vacinas polivalentes (Oliveira 1999).

Em virtude de não ter sido identificado nenhum animal portador de leptospira por meio da IFD, pode-se inferir que este resultado está relacionado às práticas de saneamento adotadas nas granjas, proporcionando o controle da infecção por meio de uma série de medidas, como por exemplo, a prática generalizada de vacinação de animais reprodutores, cuja prole (animais em terminação) recebe anticorpos de forma passiva. Além disso, as melhores condições de higiene adotadas no manejo e nas instalações, necessárias na suinocultura tecnificada, que incluem o controle de roedores, principal fonte de eliminação da bactéria (Badke 2001, Rende 2007, Soto 2007) favorecem a manutenção da sanidade dos animais. Complementarmente, a adoção de tratamento com antimicrobianos e o curto período de permanência dos animais terminados nas granjas contribuem para este quadro (Ribotta et al. 1999, Drolet et al. 2002)

Apesar da rapidez e facilidade na execução da técnica e na série de vantagens apresentadas, alguns autores que a utilizaram para a detecção de antígenos de *Leptospira* spp. em amostras de outros tecidos biológicos e fluidos de outras espécies animais, consideraram-na de baixa sensibilidade (Anzai 2006, Brown et al. 2003). Estes autores recomendam sua associação a outras técnicas, como por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No entanto, esta última permite a identificação de fragmentos de DNA do microrganismo. Embora possua algumas limitações, Donahue et al. (1991) e Oliveira Filho (2010) afirmam que a IFD é um teste bastante útil, rápido e eficaz para se estabelecer o diagnóstico desta doença sendo utilizado por vários laboratórios com resultados satisfatórios. Pescador et al. (2004) corroboram os autores supracitados, afirmando que este é um teste bastante útil no diagnóstico definitivo desta doença.

### **CONCLUSÃO**

O risco de contaminação por *Leptospira* spp. para trabalhadores de matadouros frigoríficos sob inspeção sanitária que abatem suínos provenientes das granjas tecnificadas analisadas é baixo. No entanto é de fundamental importância o constante monitoramento deste agente etiológico, em função de seu potencial zoonótico.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Almeida L.P., Martins L.F.S. & Brod C.S. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. *Rev. Saude Publica*, 28(1):76-81, 1994.

Anzai E.K. Utilização da PCR para o diagnóstico da leptospirose em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006. 48p. (Capturado em: <  
[http://www.uel.br/pos/ciencia\\_animal/arquivos/2006Eleine%20Anzai.pdf](http://www.uel.br/pos/ciencia_animal/arquivos/2006Eleine%20Anzai.pdf)>)

Badke M.R.T. *Leptospirose*. CONGRESSO ABRAVES, Santa Catarina, 2001. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1\\_manoelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1_manoelrenato.pdf)> Acesso em: 02 dezembro, 2011.

Baker T., McEwen S., Prescott J. & Meek A. The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. *Can. J. Vet. Res.*, 53(3):290-294, 1989.

Bastos M. *Leptospirose*. Disponível em:<<http://www.cca.ufes.br/caklbacteri.htm>>. Acesso em: 14 novembro, 2011.

Blaaha T. *Applied veterinary epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 1989. p.95-103.

Brown P.D., Carrington D.G., Gravekamp C., Van de Kemp H., Edwards C.N., Jones S.R., Prussia P.R. & Garriques S. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol.*, 154(4):581-586, 2003.

Donahue J., Smith B., Redmon K. & Donahue J. Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3(2):148-51, 1991.

Drolet R., D'Allaire S., Laroche R., Magar R., Ribotta M. & Higgins R. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *Vet. Rec.*, 150(5):139-143, 2002.

Ellis W., O'Brien J., Neill S., Ferguson H. & Hanna J. Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.*, 110(7):147-150, 1982.

Ellis W.A. Leptospirosis in pig. *Pig Vet. J.*, 28:24-34, 1992.

Faine S., Alder B., Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2 ed. CRC Press, MedSci, Melbourne, 1999. 368p.

Faine S. *Leptospira and Leptospirosis*. CRC Press: Boca Raton, 1994. 353p.

Genovez M. E. Leptospirose, uma doença para além da época das chuvas. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_1/leptospirose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/leptospirose/index.htm)>. Acesso em: 14 novembro, 2011.

Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol.*, 14:296-326, 2001.

Martinez J., Segales J., Aduriz G., Atxaerandio R., Jaro P., Ortega J., Peris B. & Corpa J.M. Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. *Res. Vet. Sci.*, 81(1):92-98, 2006.

Mérien F. & Artharid A.B. Leptospirosis a zoonotic under monitoring in New Caledinia and in the Pacific. *Prev. Vet. Med*, 200(374):45-50, 2005.

Miller D. A., Wilson M.A., Kirkbride, C. A. Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1:146-149, 1989.

Oliveira S.J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? *Hora Vet.* 19: 87-90, 1999.

Pescador C. A., Corbelline L.G., Loretto A.P., Júnior E.W., Frantz F.J. & Driemeier D. Aborto eqüino por *Leptospira sp.* *Cienc. Rural*, 34(1):271-274, 2004.

Perry G. & Heardy R. *A Scientific Review of Leptospirosis and implications for quarentene policy*. Editora Canberra, Austrália, 2000. 115p.

Rende J. C., Rigobelo E. C., Marin J. M. & Ávila F. A. Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans sorovar wolffi*: determinação de parâmetros bioquímicos. *Cienc. Rural*, 37(2):458-463, 2007.

Rentko V.T., Clark N. & Ross L.A. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J. Vet. Int. Med.*, 6:235-244, 1992.

Ribotta M., Higgins, R. & Perron, D. Swine leptospirosis: low risk of exposure for humans? *Can. Vet. J.* 40(11):809-810, 1999.

Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. Pallotti, Santa Maria, 2007.

Santa-Rosa C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, 1:97-109, 1970.

Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. *Doenças dos suínos*. Cãnone Editorial, Goiânia, 2007. 780p.

Sobestiansky J., Barcellos D., Mores N., Carvalho L.F. & Oliveira S. *Clínica e patologia suína*. 2ª ed. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999. 464p.

Oliveira Filho J.X. Estudo patológico, etiológico e importância econômica de nefrites em suínos abatidos no estado de Mato Grosso. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2010. 59p.  
(Capturado em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp125153.pdf>>).

Soto F.R.M., Vasconcellos S.A., Pinheiro S.R., Bernarsi F. & Camargo S.R. 2007. Artigo de revisão: Leptospirose suína. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 74:379-395.

### 3.5 HISTOPATOLOGIA DE TONSILAS E LINFONODOS DE SUÍNOS DE ABATE: VERIFICAÇÃO DE LESÕES ASSOCIADAS AO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2

Enviado para o periódico "*Acta Scientiae Veterinariae*" (Qualis B1)

**HISTOPATOLOGIA DE TONSILAS E LINFONODOS DE SUÍNOS DE ABATE:  
VERIFICAÇÃO DE LESÕES ASSOCIADAS AO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2**

KÊNIA DE FÁTIMA CARRIJO<sup>1</sup>; ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO<sup>2</sup>; NELSON  
MORÉS<sup>3</sup>; JANICE REIS CIACCI-ZANELLA<sup>3</sup>; ROGERIO TORTELLY<sup>4</sup>

**ABSTRACT**

**Background:** The porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with various syndromes, responsible for economic losses in the pork industry worldwide, and infection subclinical infection is currently considered the most common manifestation. The histological lesions in various organs, attributed to PCV2 were evaluated and described previously by other authors. However, these lesions refer to animals with clinical symptoms, there are few reports about the subclinical manifestation of these lesions. The aim of this study was to identify and characterize the microscopic lesions observed in tonsil and lymph node lymphoid organs finishing swine slaughtered under sanitary inspection, subclinically infected with PCV2 and compare them with the presence of this virus by Nested-PCR.

**Materials, Methods & Results:** Were evaluated histopathologically and examined for PCV2 by nested PCR (N-PCR), tonsil and lymph node samples from 100 pigs termination without

---

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Av. Pará, 1720, Bloco 2T, Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. CEP: 38400-902. E-mail: keniacarrijo@famev.ufu.br

<sup>2</sup> Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF). E-mail: elmiro@vm.uff.br.

<sup>3</sup> Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, SC, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária – Universidade Federal Fluminense (UFF). E-mail: rtortelly@hotmail.com.

clinical signs consistent with infection associated with PCV2, slaughtered under sanitary inspection. After *post-mortem* sanitary inspection, were collected samples of tonsil and tracheobronchial lymph node. Part of each sample was placed in flasks containing 10% buffered formalin and the other part was placed in polypropylene tubes, which were kept at -70 C until time of use. After the fixation, the samples preserved in formalin were histologically processed through routine methods, stained with hematoxylin and eosin and were evaluated under light microscopy. The material from the frozen (-70 C) was investigated DNA PCV2 by N-PCR. The results were stored in the data base and analyzed statistically using the Software BioEstat 5.0. Histologically, 46% of lymph nodes and 94% of the tonsils did not show any microscopic change. Evidence of lymphoid depletion were found in 6% of lymph nodes and in 3% of the tonsils analyzed. Among the microscopic changes, the most frequent was the presence of indistinct follicles in lymph nodes (37%), tonsil (3%). Jointly, there was so much the presence of lymphoid depletion than follicles indistinct in 11% of lymph nodes. The N-PCR can be detected in DNA from PCV2 on 76% and 67% (67/100) of lymph nodes and tonsils analyzed, respectively. Were investigated the joint presence of this agent in 57% of the lymphoid organs analyzed. The concordance by Kappa between the diagnosis of PCV2 by N-PCR between the two bodies was 0.29 (29%) were in agreement with each other ( $p < 0.05$ ). The Odds Ratio value was equal to 4.2, which means that the probability to detect DNA from PCV2 by N-PCR was 4.2 times higher in the lymph node than tonsil ( $p < 0.05$ ). 42% of the animals that had microscopic lesions in the lymph node had PCV2 by N-PCR. In contrast, we detected the presence of DNA of this agent in 35% of lymph nodes and in 62% of the tonsils without lesions.

**Discussion:** Although the analyzed animals do not show clinical PCV2 can be seen that histopathological lesions typical of this event can be observed in these clinically normal animals, although such lesions were mild. The data presented in this study support the

changing health scenery of pigs in relation to PCV2, due to the success of vaccination against PCV2 in parallel with the control of clinical disease led to a reduction of tissue damage caused by this agent, limited to subclinical infections, with outbreaks occasional nature of this disease. Despite the significant detection of PCV2 DNA, the histopathological lesions in lymphoid organs were mild. This situation reflects the change of sanitary status of pigs at relation the PCV2 compared to after the widespread adoption of vaccination of livestock, so that the clinical manifestation of the disease is now rare.

**Keywords:** Histopathology, PCV2, tonsil, lymph node, Nested-PCR.

**Descritores:** Histopatologia, PCV2, tonsila, linfonodo, Nested-PCR.

## INTRODUÇÃO

O Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é reconhecido como o agente primário de diversas síndromes [45,39,17], responsáveis por importantes perdas econômicas na indústria de carne suína em todo o mundo [8,41]. No entanto, após a infecção com o PCV2, alguns suínos desenvolvem a enfermidade na sua forma clínica ou subclínica [48], sendo que os mecanismos precisos para que uma forma ou outra desenvolva ainda não estão totalmente esclarecidos [20].

Tão importante quanto a doença clínica, a infecção subclínica tem ganhado grande importância nos estudos das enfermidades associadas ao PCV2 [11,50,52], sendo considerada atualmente a forma mais comum de manifestação após a recomendação e adoção da vacinação contra o PCV2, que possibilitou a redução de seu impacto nos parâmetros produtivos nos rebanhos [53].

Sabe-se que a manifestação da infecção subclínica é caracterizada, além da ausência de sinais clínicos, pelas baixas quantidades de PCV2 e nenhuma ou leve presença de lesões



histopatológicas nos tecidos, sobretudo os linfóides [17,47]. Lesões histológicas em diversos órgãos, atribuídas ao PCV2, foram avaliadas e descritas anteriormente por outros autores [32,27,30,42,15,21,30,2,25,17]. Entretanto estas lesões referiam-se a animais que apresentavam manifestações clínicas, havendo poucos relatos a cerca destas lesões na manifestação subclínica desta enfermidade.

Baseados nos fatos expostos, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar as lesões microscópicas verificadas nos órgãos linfóides tonsila e linfonodo de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária, infectados subclínicamente com o PCV2 e compará-las com a presença do vírus pela Nested-PCR.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### *Procedência e processamento histológico do material*

Para esta pesquisa foram coletadas amostras de tecidos biológicos de 100 suínos de terminação, abatidos sob inspeção sanitária no estado de Santa Catarina, provenientes de 50 granjas situadas em 31 cidades no oeste deste estado, durante o mês de fevereiro de 2011. Na ocasião da inspeção *ante-mortem*, nenhum dos animais apresentava sinais clínicos compatíveis com as doenças associadas ao PCV2, tais como palidez de pele e/ou icterícia, emagrecimento excessivo, hipertrofia de linfonodos inguinais superficiais, dispnéia, diarreia [18,26,32,47] e lesões dérmicas multifocais de coloração vermelha escura [13]. Após o abate e realização da inspeção *post-mortem*, foram coletados de um mesmo animal, amostras de tonsila e linfonodo traqueobrônquico. Uma parte de cada amostra foi acondicionada em frascos separados contendo formalina a 10% tamponada e a outra parte foi acondicionada em frascos de prolipropileno, os quais foram mantidos a -70°C até o momento do uso.

Com relação às amostras conservadas em formalina, após a fixação, estas foram processadas histologicamente por meio dos métodos de rotina [3], incluídas em blocos de

parafina, os quais foram seccionados em cortes de 4µm, montados em lâmina para microscopia e corados com hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente foram avaliados sob microscopia óptica.

A fim de se verificar a presença de lesões microscópicas sugestivas de PCV2 nos órgãos linfóides avaliados (tonsila e linfonodo), adotou-se os critérios propostos por Opriessnig *et al.* [33] quanto à depleção linfóide, cujos escores variam de zero a três (zero: ausência de depleção linfóide; um: depleção linfóide com perda da celularidade global; dois: moderada depleção linfóide; três: severa depleção linfóide com perda da estrutura folicular linfóide. Foi verificada ainda a presença de folículos indistintos, infiltração histiocítica e células gigantes multinucleadas, conforme Hansen *et al.* [17], formação de granulomas e presença de corpúsculos de inclusão conforme O’Dea *et al.* [30].

#### *Detecção Molecular de PCV2*

A partir do material congelado (-70°C), foi pesquisado o DNA de PCV2 por meio da Nested-PCR (N-PCR). O DNA foi extraído conforme Ciacci-Zanella *et al.* [7] e Sambrook & Russell [43].

Os “primers” utilizados na primeira etapa da reação (PCR externa) foram aqueles previamente descritos por [14] e na segunda etapa (PCR interna), aqueles previamente descritos por [22]. As reações foram realizadas conforme Kim *et al.* [23]. Como controle positivo, foi utilizada amostra de PCV2 isolada de suínos com sinais clínicos e lesões de doenças associadas ao PCV2 [6]. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo nas reações. Após a amplificação dos produtos, estes foram visualizados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo. A visualização e a fotodocumentação foram realizadas sob luz ultravioleta.

#### *Análise estatística*

Para a análise estatística, os resultados foram armazenados em banco de dados e posteriormente analisados por meio do Software BioEstat 5.0. Pela estatística descritiva, obteve-se o percentual de alterações microscópicas nos tecidos linfóides analisados. O Índice de concordância ajustada (Kappa) e o *Odds ratio* foram calculados para verificar o relacionamento entre o diagnóstico de PCV2 pela N-PCR entre os dois órgãos, além de mostrar a concordância entre a presença de lesões microscópicas sugestivas de PCV2 e o diagnóstico deste agente pela N-PCR. O teste de McNemar com alfa igual a 5% foi usado para verificar a associação entre o diagnóstico microscópico de PCV2 e presença deste agente pela N-PCR, tanto na tonsila quanto no linfonodo.

## **RESULTADOS**

### *Alterações microscópicas*

As alterações microscópicas sugestivas de infecção por PCV2 nos órgãos linfóides analisados (tonsila e linfonodo traqueobrônquico) estão representadas na figura 1. Dentre os órgãos linfóides analisados, 46% dos linfonodos e 94% das tonsilas não apresentavam nenhuma alteração microscópica. Evidências de depleção linfóide foram encontradas em 6% dos linfonodos analisados, sendo que destes, 4% foram classificados como sendo de grau 1 (suave depleção linfóide). Quanto à tonsila, o percentual de depleção foi de 3%.

Com relação aos folículos indistintos, 37% dos linfonodos e 3% das tonsilas apresentaram esta alteração. De forma conjunta, foi verificada tanto a presença de depleção linfóide quanto de folículos indistintos em 11% dos linfonodos. Não foi detectada a presença de células gigantes multinucleadas, granulomas e corpúsculos de inclusão nos animais analisados. Em alguns tecidos, verificou-se a presença de histiócitos, cuja infiltração era discreta.

### *Deteção molecular de PCV2 em tonsila e linfonodo*

Pela N-PCR, pode-se detectar o DNA de PCV2 em 76% e 67% dos linfonodos e tonsilas analisados, respectivamente. Foi verificada a presença conjunta deste agente em 57% dos órgãos linfóides analisados, conforme pode-se observar na tabela 1. A concordância por *Kappa* entre o diagnóstico de PCV2 pela N-PCR entre os dois órgãos foi de 0,29 (29%), havendo concordância entre si ( $p < 0,05$ ). O valor de *Odds Ratio* foi igual a 4,2 (IC 1,60 a 11,00), o que significa que a probabilidade de se detectar DNA do PCV2 pela N-PCR foi 4,2 vezes maior no linfonodo do que na tonsila ( $p < 0,05$ ).

#### *Associação de lesões microscópicas e presença de PCV2 em linfonodos e tonsilas*

Conforme pode ser verificado na tabela 2, 42% dos animais que apresentaram lesões microscópicas no linfonodo também possuíam PCV2 pela N-PCR. Em contrapartida, foi detectada a presença do DNA deste agente em 35% dos linfonodos sem lesão. A concordância por *Kappa* entre lesão microscópica de linfonodo e PCR para PCV2 foi de 0,0176 (1,76%), ou seja, esses resultados foram pouco concordantes, não havendo associação entre eles  $p > 0,05$ . Pelo teste de McNemar verificou-se que há uma associação significativa ( $p < 0,0001$ ) entre presença de lesões microscópicas neste órgão e detecção de PCV2.

Na tabela 3, pode-se verificar que 5% das tonsilas que apresentaram lesões microscópicas, foram positivas também para PCV2. No entanto, 62% das tonsilas sem lesões, foram positivas para este agente. Pelo teste de McNemar, verificou-se que há uma associação significativa ( $p < 0,0001$ ) entre presença de lesões microscópicas em tonsila e PCV2. A concordância por *Kappa* entre lesão microscópica de tonsila e PCR para PCV2 foi de 0,0302 (3,02%), sendo esses resultados pouco concordantes, não havendo associação entre eles ( $p > 0,05$ ).

## Discussão

### *Alterações microscópicas*

As alterações microscópicas sugestivas de PCV2 encontradas nos órgãos linfóides analisados coincidem com aqueles que foram descritos por Simão [50], que após ter avaliado 64 linfonodos inguinais de suínos infectados subclínicamente com PCV2, verificou que 53,13% não apresentaram nenhuma lesão significativa. Quanto à depleção linfóide, os resultados foram inferiores aqueles descritos por outros autores [17,50]. Hansen *et al.* [17] após terem analisado a ocorrência e a distribuição de PCV2 em suínos de terminação na Dinamarca, também sem manifestação clínica de doenças associadas ao PCV2 no momento do abate, verificaram que 53,9% dos linfonodos traqueobrônquicos possuíam depleção. Simão [50] verificou ainda que 37,5% dos animais, sem manifestação clínica, apresentaram leve depleção linfóide. Ainda com relação à depleção linfóide, Quintal *et al.* [37] encontraram 40% em linfonodo e 20% em tonsila, em animais portadores de lesões macroscópicas sugestivas de PCV2.

O grau de depleção linfóide está diretamente relacionado com a quantidade de antígenos de PCV2 nos tecidos [44,46,10,16]. Assim, essa alteração pode ser um resultado direto da replicação viral em tecidos linfóides, induzindo a uma lise e destruição de estruturas linfóides; uma consequência indireta da infecção, tal como a apoptose da célula hospedeira em resposta à infecção [39] ou uma combinação de vários mecanismos [9]. Nesse sentido, as causas da depleção linfóide ainda não estão totalmente esclarecidas, devendo, portanto, continuar sendo investigadas [9].

Com relação aos folículos indistintos, os resultados encontrados diferem daqueles descritos por Hansen *et al.* [17], que verificaram percentuais inferiores (9,6% de folículos indistintos em linfonodo traqueobrônquico, também em animais sem manifestação clínica).

Krakowa *et al.* [27] também não verificaram corpúsculos de inclusão viral em linfonodos e detectaram raras células gigantes multinucleadas em suínos com infecção subclínica.

Apesar dos animais analisados não apresentarem manifestação clínica pelo PCV2, pode-se verificar que lesões histopatológicas típicas desta manifestação podem ser observadas nestes animais clinicamente normais [40], embora tais lesões sejam discretas. Segundo Olvera *et al.* [31] a dinâmica da infecção viral relacionada com o desenvolvimento das lesões e tempo de recuperação das mesmas, são ainda desconhecidos, necessitando de maiores investigações.

#### *Deteção molecular de PCV2 em tonsila e linfonodo*

Os resultados encontrados no presente estudo quanto à detecção de DNA de PCV2 pela N-PCR foram inferiores aos encontrados por Hansen *et al.* [17], que encontraram 97% de positividade para este agente e Chiou *et al.* [5], que detectaram em 90%, adotando também a técnica de PCR como método de diagnóstico. No entanto, os resultados apresentados aproximam-se dos resultados descritos por Palzer *et al.* [34], que detectaram 73% e Liu *et al.* [28], que detectaram o DNA de PCV2 em 53% de suínos saudáveis na ocasião do abate. Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças no *status* de saúde dos animais e/ou mudanças na epidemiologia do PCV2 durante este período, em virtude da introdução da prática de vacinação, fazendo com que a principal manifestação das doenças associadas ao PCV2 atualmente seja a subclínica [53].

Com relação à maior facilidade de detecção do PCV2 em linfonodo em relação à tonsila, Moreno *et al.* [29] também verificaram tal situação, recomendando que o material de eleição para detecção do PCV2 através da PCR deveria ser o linfonodo.

Os vários possíveis mecanismos envolvidos no desencadeamento ou manifestação clínica ou subclínica das doenças associadas ao PCV2 continuam intrigando a comunidade científica, uma vez que animais positivos para a presença do vírus podem não apresentar

nenhum dos seus sinais clínicos [1]. Concorda-se que o PCV2 é ubiqüitário na população suína, mas não há um claro consenso a respeito do significado da prevalência de DNA de PCV2 nesses animais [32,39]. A simples presença do vírus não necessariamente indica ou induz a enfermidade [36]. A técnica de PCR apenas indica que o animal está infectado pelo agente pesquisado no momento em que se realizou a coleta da amostra para o referido exame [4]. Baseado neste fato, alguns autores [51,38,45] sugeriram que o diagnóstico da enfermidade deve ser fundamentado na intensidade de lesões histológicas observadas em órgãos linfóides como linfonodos e tonsila, associada à presença/quantificação de vírus nas lesões.

#### *Associação de lesões microscópicas e presença de PCV2 em linfonodos e tonsilas*

Os resultados quanto à detecção de PCV2 pela N-PCR em linfonodos que apresentavam lesões microscópicas estão de acordo com Krakowa *et al.* [27], que detectaram alterações microscópicas como depleção linfóide em amostras de linfonodos de animais saudáveis, porém positivos para PCV2.

Apesar da não manifestação clínica da doença em animais positivos para PCV2, alguns animais possuíam lesões nos órgãos linfóides analisados. Diante destes achados, pode-se caracterizar o quadro encontrado como de infecção subclínica pelo PCV2, pois segundo Segalés *et al.* [45], o diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados por este agente.

Os dados apresentados no presente trabalho reforçam a mudança no cenário da saúde de suínos com relação ao PCV2, conforme afirmação de Segalés [47]. Este autor comenta que o sucesso da vacinação contra o PCV2 em paralelo com o controle da doença clínica permitiram uma redução das lesões teciduais causadas por este agente [12,19,24,35,49], limitando-se a infecções subclínicas, com surtos ocasionais desta enfermidade.

## Conclusões

Apesar da expressiva detecção de DNA de PCV2, as lesões histopatológicas detectadas nos órgãos linfóides tonsila e linfonodo em suínos de terminação na ocasião do abate foram brandas. Este quadro reflete a mudança no cenário de saúde de suínos com relação ao PCV2 após a adoção generalizada da vacinação dos rebanhos, de forma que a manifestação clínica da enfermidade atualmente é rara.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro; Ao Centro Nacional de Pesquisa Suínos e Aves - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPQA/EMBRAPA), em especial à Dra Janice Reis Ciacci-Zanella pelo fornecimento de DNA de PCV2 usado como controle positivo nas reações de PCR e à Neide Lisiane Simon e Camila Sá Rocha pelo auxílio na execução das PCRs.

## REFERENCIAS

- 1 **Allan G.M. & Ellis J. 2000.** Porcine circovirus: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12:3-14.
- 2 **Allan G.M., Kennedy S., McNeilly F., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka S.J., Meehan B.M. & Adair B.M. 1999.** Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*. 121(1):1-11.
- 3 **Allen T.C. 1992.** Hematoxylin and eosin. In: *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington: American Registry of Pathology, pp. 53-58.
- 4 **Barcellos D.E.S.N., Sobestiansky J., Moreno A.M., Purto R.N.G. & Souza M.A. 2005.** Utilização do diagnóstico laboratorial. In: Sobestiansky J., Barcellos D. E.S.N., Moreno A.M., Sobestiansky A. & Poleze E. (Eds). *Suínos: Coleta e remessa de material para laboratórios para fins de diagnóstico*. Goiânia: Art 3, pp.13-41.
- 5 **Chiou M. T., Lin C. N., Chuang M.S., Chiang H.C. & Tsai C. P. 2004.** Etiological and epidemiological survey of PRDC associated pathogens in Taiwan. In: *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*. (Hamburg, Germany). p. 191.
- 6 **Ciacci-Zanella J.R. & Mores N. 2003.** Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55:522-527.



- 7 **Ciacci-Zanella J.R., Morés N., Simon N.L., Oliveira S.R. & GAVA, D. 2006.** Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Ciência Rural*. 36(5):1480-1485.
- 8 **Csagola A., Kecskemeti S., Kardos G., Kiss I. & Tuboly T. 2006.** Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boards. *Archives of Virology*. 151:495-507.
- 9 **Darwich L. & Mateu E. 2012.** Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). Review. *Virus Research*. 164(1-2):61-67.
- 10 **Darwich L., Segalés J., Domingo M. & Mateu E. 2002.** Changes in the CD4+, CD8+, CD4/CD8 double positive cells and IgM+ cell subsets in peripheral blood mononuclear cells from postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age matched uninfected wasted and healthy pigs, correlates with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(2):236–242.
- 11 **Darwich L., Segalés J., Resendes A., Balasch M., Plana-Durán J. & Mateu E. 2008.** Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Research Veterinary Science*. 84(2):194–198.
- 12 **Desrosiers R., Clark E., Tremblay D., Tremblay R. & Polson D. 2009.** Use of a one dose subunit vaccine to prevent losses associated with porcine circovirus type 2. *Journal of Swine Health and Production*. 17:148–154.
- 13 **Drolet R., Thibault S., D’Allaire S., Thomson J.S. & Done S.H. 1999.** Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Swine Health and Production*. 7(6):283-285.
- 14 **Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy, S. & McNeilly F. 1999.** Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wast-ing syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11:3–14.
- 15 **Galindo-Cardiel I., Grau-Roma, L., Pérez-Maillo M. & Segalés J. 2011.** Characterization of necrotizing lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Comparative Pathology*. 144(1):63–69
- 16 **Grierson S.S., King D.P., Tucker A.W., Donadeu M., Mellencamp M.A., Haverson K., Banks M. & Bailey M. 2007.** Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pig: correlation with the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 119:254–268.
- 17 **Hansen M.S., Pors S.E., Bille-Hansen V., Kjerulff S.K.J. & Nielsen O. L. 2010.** Occurrence and Tissue Distribution of Porcine Circovirus Type 2 Identified by Immunohistochemistry in Danish Finishing Pigs at Slaughter. *Journal of Comparative Pathology*. 142:109-121.

- 18 **Harding J.C. & Clark E.G. 1997.** Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health Production*. 5:201–203.
- 19 **Horlen K.P., Dritz S.S., Nietfeld J.C., Henry S.C., Hesse R.A., Oberst R., Hays M., Anderson J. & Rowland R.R. 2008.** A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 232(6):906–912.
- 20 **Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segalés J. & Allan G.M. 2010.** Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 136(3–4):185–193.
- 21 **Kim J. & Chae C. 2004.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation. *Journal of Comparative Pathology*. 131(2–3):121–126.
- 22 **Kim J. & Chae C. 2001.** Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *Journal of Virology Methods*. 92:105–111.
- 23 **Kim J., Han D.U., Choi C. & Chae C. 2001.** Differentiation of porcine circovirus PCV1 and PCV2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 98(1):25–31.
- 24 **Kixmoller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmuller A., Elbers K. & Fachinger. 2008.** Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*. 26(27–28):3443–3451.
- 25 **Krakovka S., Ellis J.A., McNeilly F., Gilpin D., Meehan B., McCullough K. & Allan G. 2002.** Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunology*. 15(4):567–582.
- 26 **Krakovka S., Ellis J.A., McNeilly F., Meehan B., Oglesbee M., Alldinger S. & Allan G. 2004.** Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Veterinary Pathology*. 41(5):471–481.
- 27 **Krakovka S., Ellis J.A., McNeilly F., Waldner C. & Allan G. 2005.** Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17:213–222.
- 28 **Liu Q., Wang L., Willson P., O'Connor B., Keenliside J., Chirino-Trejo M., Meléndez R. & Babiuk L. 2002.** Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 66:225–231.
- 29 **Moreno A.M., Castro A.M.M.G., Paixão R., Cortez A., Doto D.S., Leomil H., Baccaro M.R. & Richtzenhain L.J. 2003.** Associação entre Circovírus suíno tipo 2 e as doenças

- respiratórias no Brasil. In: *Anais do XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos*. (Goiânia, Brasil). pp.101-102.
- 30 O'Dea M.A., Kabay M.J., Carr J., Wilcox G.E. & Richards R.B. 2011.** Porcine circovirus-associated disease in weaner pigs in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*. 89(4):122-130.
- 31 Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J. & Domingo M. 2004.** Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*. 117(1):75–80.
- 32 Opriessnig T., Meng X.J. & Halbur P.G. 2007.** Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19:591-615.
- 33 Opriessnig T., Thacker E.L., Yu S., Fenaux M., Meng J. & Halbur P.G. 2004.** Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*. 41:624-640.
- 34 Palzer A., Ritzmann M., Wolf G. & Heinritzi K. 2008.** Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Veterinary Record*. 162:267-271
- 35 Pejsak Z., Podgorska K., Truszczynski M., Karbowski P. & Stadejek T. 2010.** Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease*. 33(6):e1-e5.
- 36 Pinto F.P. 2004.** Padronização e aplicação da técnica de PCR “Nested” no diagnóstico do circovirus suíno tipo II em tecidos. 2004. 61f. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- 37 Quintal M., Guillermo J.L., Rodriguez J.C., Torres M.A., Miranda R., Colin R. 2010.** Type of lesions associated on Porcine Circovirus type 2 in organs of positive swine for immunohistochemistry. In: *Proceedings of the 21<sup>st</sup> International Pig Veterinary Society Congress*. (Vancouver, Canada). p.319.
- 38 Quintana J., Segales J., Rosell C., Calsamiglia M., Rodriguez-Arrijoja GM., Chianini F., Folch J.M., Maldonado J., Canal M., Plana-Duran J. & Domingo M. 2001.** Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*. 149:357–361.
- 39 Ramamoorthy S. & Meng X. 2008.** Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Animal Health Research Reviews*. 10(1):1–20
- 40 Rodríguez-Arrijoja G.M., Segalés J., Balash M., Rosell C., Quintant J., Folch, J.M.; Pala-Duran J., Mankertz A. & Domingo M. 2000.** Serum antibodies to Porcine

- circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Veterinary Record*. 146:762-764.
- 41 Rodríguez-Arriola G.M., Segalés J., Rosell C., Rovira A., Pujols J., Plana-Duran J. & Domingo M. 2003.** Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 50(2):99–101.
- 42 Rosell C., Segales J., Plana-Duran J., Balasch M., Rodriguez-Arriola G.M., Kennedy S., Allan G., McNeilly F., Latimer K.S. & Domingo M. 1999.** Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*. 146:40-43.
- 43 Sambrook J. & Russell D.W. 1989.** *Molecular cloning, a laboratory manual* (v.3), 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 545p.
- 44 Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G. & Marcato P.S. 2001.** Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 83:53–67.
- 45 Segalés J., Allan G.M. & Domingo M. 2005.** Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*. 6(2):119–142.
- 46 Segales J., Alonso F., Rosell C., Pastor J., Chianini F., Campos E., Lopez-Fuertes L., Quintana J., Rodriguez-Arriola G., Calsamiglia M., Pujols J., Dominguez J. & Domingo M. 2001.** Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 81:37–44.
- 47 Segalés J. 2012.** Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*. 164(1-2):10-19.
- 48 Segalés J. 2002.** Update on post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Journal of Swine Health Production*. 10:277-281.
- 49 Segalés J., Urniza A., Alegre A., Bru T., Crisci E., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Balasch M., Sibila M., Xu Z., Chu H.J., Fraile L. & Plana-Duran J. 2009.** A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine*. 27(52):7313–7321.
- 50 Simão G.M.R. 2010.** Doença subclínica associada ao porcine circovirus-2 (PCV2) em rebanho suíno: avaliação sorológica, histopatológica e quantificação viral. 58f. Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde\\_arquivos/8/TDE-2010-07-16T100507Z-2451/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/8/TDE-2010-07-16T100507Z-2451/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acessado em: 01/2012.

- 51 Sorden S. 2000.** Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Production*. 8(3):133–136.
- 52 Steiner E., Balmelli C., Gerber H., Summerfield A. & McCullough K. 2009.** Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Veterinary Research*. 5:45.
- 53 Young M.G. Cunningham G.L., Sanford S.E. 2011.** Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production*. 19(3):175-180.

**Tabela 1.** Relação entre diagnóstico pela N-PCR para PCV2 em tonsilas e linfonodos de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária.

PCR PCV2 em Linfonodo	PCR PCV2 em tonsila		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos	57 (57,0)	19 (19,0)	76 (76)
Negativos	10 (10,0)	14 (14,0)	24 (24)
<b>Total</b>	<b>67 (67,0)</b>	<b>33 (33,0)</b>	<b>100 (100)</b>

Concordância por *Kappa*: 0,29; Concordância observada: 0,71;  $p=0,0012$   
*Odds Ratio*: 4,2; IC = 1,6027 a 11,0065;  $p=0,0055$

**Tabela 2.** Relação entre lesões microscópicas e presença de PCV2 em linfonodos de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária.

Lesões Microscópicas	PCV2 em linfonodo		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Positivos	42 (42,0)	12 (13,0)	54 (54,0)
Negativos	35 (35,0)	11 (10,0)	46 (46,0)
<b>Total</b>	<b>77 (77,0)</b>	<b>23 (23,0)</b>	<b>100 (100)</b>

\*McNemar significativo ( $p=0,0008$ ).

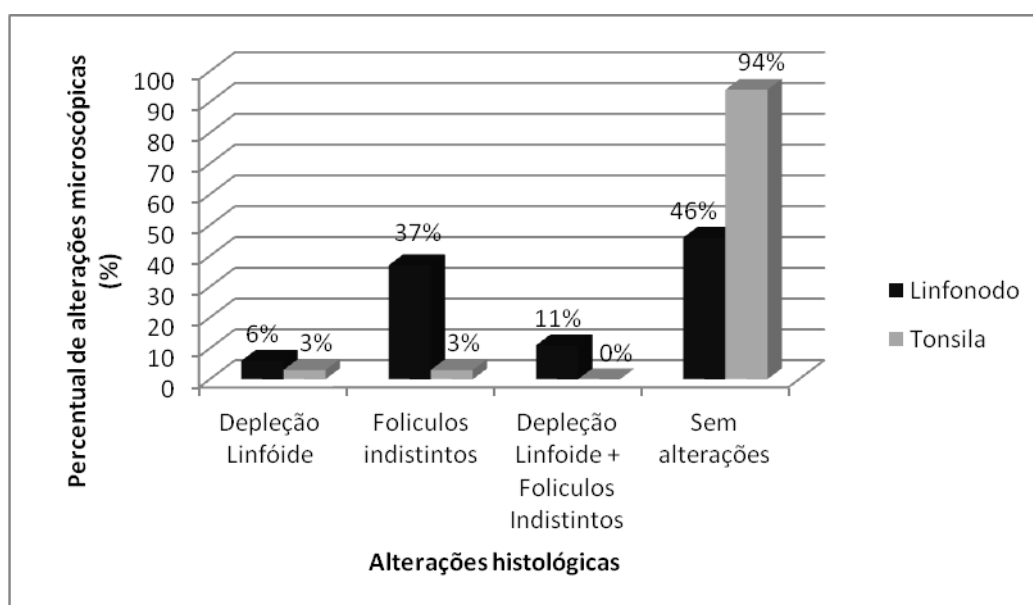
Concordância por *Kappa*: 0,0176; concordância observada: 0,53;  $p=0,4206$ .

**Tabela 3.** Relação entre lesões microscópicas e presença de PCV2 em tonsilas de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária.

Lesões	PCV2 em tonsila		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Microscópicas			
Positivos	5 (5,0)	1 (1,0)	6 (6,0)
Negativos	62 (62,0)	32 (32,0)	94 (94,0)
<b>Total</b>	<b>67 (67,0)</b>	<b>33 (33,0)</b>	<b>100 (100)</b>

\*McNemar significativo ( $p < 0,0001$ ).

Concordância por *Kappa*: 0,0302; concordância observada: 0,37;  $p = 0,1901$ .



**Figura 1.** Principais alterações microscópicas compatíveis com doenças associadas ao PCV2 em tonsila e linfonodo traqueobrônquico de suínos de terminação abatidos sob Inspeção Sanitária no estado Santa Catarina, Brasil.

3.6 PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA: RELATIONSHIP BETWEEN MICROSCOPIC LUNG AND KIDNEY LESIONS IN SANTA CATARINA, BRAZIL.

Publicado na Revista "Bioscience Journal" (Qualis B2) em maio/junho de 2011.



**Porcine Enzootic Pneumonia: relationship between microscopic lung and kidney lesions in Santa Catarina, Brazil.**

**Pneumonia Enzoótica Suína: relação entre lesões microscópicas pulmonares e renais em Santa Catarina, Brasil.**

**Abstract**

In this work the relationship between lung lesions of pigs with Enzootic Pneumonia and kidney lesions during sanitary inspection at slaughter was investigated. For this purpose sixty-nine Enzootic Pneumonia positive lung samples and sixty-nine negative ones as well as kidneys from the same pigs were *post mortem* examined. Microscopic examination revealed that 54.28% of the pigs (58/138) had both lesions, an association significant by Chi-square ( $P < 0.05$ ). The intensity of this association, by “Odds ratio” value of 0.2267 was also significant (0.09045-0.5683). Such result indicates that Porcine Enzootic Pneumonia positive pigs are more likely to develop nephritis. Although the relationship between lesions is uncertain, immunodepression caused by Porcine Enzootic Pneumonia is a probable cause of the concomitant renal disease.

**Key Words:** Porcine Enzootic Pneumonia. Nephritis. Swine slaughtered. Refrigerated slaughterhouses.

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre lesões pulmonares de Pneumonia Enzoótica e renais pelo Serviço de Inspeção Sanitária em suínos abatidos. Foram utilizadas amostras de pulmões com lesão de pneumonia enzoótica de 69 suínos e amostras negativas de

igual quantidade de animais. Foram coletados também amostras de rins dos 138 suínos estudados. O exame microscópico dos suínos com e sem lesão pulmonar revelou que 54,28% (57/138) estavam concomitantemente com lesões nos pulmões e rins, sendo esta associação significativa pelo Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ). A intensidade desta associação por “Odds ratio” foi de 0,2267, também significativa (0,09045-0,5683). Pôde-se concluir que existe associação entre lesões pulmonares e renais, significando que animais com lesões presuntivas de pneumonia enzoótica têm maior predisposição para desenvolverem um quadro de nefrite.

**Palavras-chave:** Pneumonia enzoótica suína. Nefrite. Suínos de abate. Matadouro-frigorífico.

## **Introduction**

One of the biggest problems faced by the pig industry, worldwide, are the diseases that involve the respiratory system of these animals (STAKENBORG et al., 2005). Among the main microorganisms involved in Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC), stands out *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of the Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) or Porcine Mycoplasmal Pneumonia (COSTA, 2002).

After inhalation, the *M. hyopneumoniae* primarily attacks the ciliated epithelium of the trachea, bronchi and bronchiole, and subsequently, causes damage to the ciliated epithelium cells by adhering to the superficial walls of the cilium and epithelium (HAESEBROUCK et al., 2004). The functional alterations of these structures can lead to adverse consequences, provoking suppressing effects in the alveolar macrophages, which are the main cells of the immunological pulmonary defense against infectious agents (TIMENETSKY, 2005), causing immunodepression (ADGBOYE, 1978). As a consequence of immunodepression, there is a

decrease in the resistance to other infectious agents, causing secondary infections (SUTER et al., 1985).

Wilkie and Mallard (1999) reported that, besides the highly probable immunodepression caused by the *M. hyopneumoniae*, the production of high levels of pro-inflammatory cytokines by the macrophages is capable of causing decrease on growth rate, resulting in a retarded pig growth. The percentage of condemnation during slaughter of these animals is much higher than in apparently healthier ones (MARTÍNEZ et al., 2007). As pointed out, slaughtered swines with multifocal interstitial nephritis (usually called “white spotted” kidneys) also present lower growth. The main causing pathogens of nephritis in pigs were searched and none of the infectious agents detected could directly be assigned as the primary cause of nephritis studied (MARTÍNEZ et al., 2006).

Even though the relationship between lung and kidney lesions in the literature is not clear, it has been observed a rather high prevalence of kidney lesions in pigs with lung lesions characteristic of PEP in the Jefferson Andrade dos Santos Pathological Anatomy Laboratory of the Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil (Rogerio Tortelly, “Personal Communication”). Moreover, there is no information in the literature linking lung and kidney lesions in the same animal.

As pointed out, the present study had the objective of statistically analyze the association between lung ascribed as PEP and kidney lesions in slaughtered swine, under sanitary inspection.

## **Material and methods**

In the present study, lungs and kidneys samples of 138 pigs from the Western region of the State of Santa Catarina, Brazil, slaughtered under Official Sanitary Inspection were used.

These pigs were about five to six months of age and had an average warm carcass weight of 84.33 Kg.

Out of those 138 pigs, 69 were assigned positive for PEP while 69 had no apparent lung lesions, as diagnosed by the Official Inspection Service. After the alternated collection of positive and negative lung fragments for PEP, kidneys fragments from the same pigs were collected, and identified accordingly.

Lung and kidney fragments were individually stored in plastic flasks, properly name-tagged, containing 10% formaldehyde solution and then sent to the Jefferson Andrade dos Santos Pathological Anatomy Laboratory of the “Universidade Federal Fluminense” (Federal Fluminense University), where they were processed according to routines techniques, waxed and stained with Haematoxylin -Eosin.

In the microscopic diagnosis of PEP cases was based on the *score* classification criteria described by Van Alstine et al. (1996), Irigoyen et al. (1998) and Scofano (2006). Score zero, absence of lesion, including peribronchial mononuclear nodules; score 1, when small nodules were present in less than 25% of the bronchi, bronchioles and vessels; score 2, when small nodules were present in more than 25% of these same tissues and score 3, when they were present in over 75% of the structures or due to the presence of larger nodules. Lungs with microscopic scores 0 and 1 were presumptively considered negative for PEP while those with microscopic scores 2 and 3, were considered positive.

In the microscopic examination of the renal tissue, the cases were considered positive in the presence of alterations on the parenchyma, such as inflammatory infiltrate of mononuclear constitution (nephritis), which could have a focal or multifocal distribution and localization interstitial, perivascular or periglomerular. The cases without renal tissue alterations were considered negative.

After data collecting, all information were transferred to a data bank for further statistical analysis at 5% level. The Chi-square test was used to test the frequency between renal and lung lesions by microscopy (positive and negative) and nephritis. Chi-squared was also used to verify the association between lung lesions scores (0, 1, 2 and 3) and the nephritis diagnosis (positive and negative) (THRUSFIELD, 2004).

## Results

Results on lung lesions score association and nephritis are described on tables 1 and 2. On table 1, where lung lesions scores and nephritis were microscopically associated, we could notice that only 21.21% of the animals with negative diagnosis for nephritis presented positivity for PEP. However, 57 pigs, 54.28% concomitantly, had the two injuries, being this association significant by Chi-square ( $P < 0.05$ ). The “Odds Ratio” obtained was small 0.2267 (0.09045-0.5683), but significant. On table 2, this association in relation to lung score lesions was also obtained by the chi-square ( $P < 0.05$ ) which implies that as lung lesion scores increase, more nephritis are encountered.

TABLE 1. Relationship between lung and kidney lesions in pigs slaughtered under Official Sanitary Inspection, according to Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) microscopic diagnosis<sup>a</sup>. March, 2007. Western region of the state of Santa Catarina, Brazil.

Nephritis	Microscopic Diagnosis PEP		
	Negative (%)	Positive (%)	Total (%)
Positive	48 (45.71)	57 (54.8)	105 (100)
Negative	26 (78.78)	07 (21.21)	33 (100)
TOTAL	74 (53.62)	64 (46.37)	138 (100)

<sup>a</sup> Chi-Square significant ( $P=0.0018$ ); OR: 0.2267 (0.09045-0.5683) also significant.

TABLE 2. Relationship between lung and kidney lesions, in pigs slaughtered under Official Sanitary Inspection according to Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) lung lesion score<sup>a</sup>. March, 2007. Western region of the state of Santa Catarina, Brazil.

Nephritis	PE Microscopic				Total (%)
	Score				
	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Positive	28 (26.66)	20 (19.04)	16 (15.23)	41 (39.04)	105 (100)
Negative	13 (39.39)	13 (39.39)	03 (9.09)	04 (12.12)	33 (100)
TOTAL	41 (29.71)	33 (23.91)	19 (13.77)	45 (32.60)	138 (100)

<sup>a</sup>Chi-square significant (P< 0.05)

## DISCUSSION

Results from this work show for the first time that pigs with PEP characteristic lesions (microscopic scores 2 and 3) are more likely to develop nephritis. According to the “Odds Ratio” (OR) obtained it can be stated that pigs with PEP lesions were at a 2.3 higher risk of developing nephritis higher than pigs without lung lesions.

This relationship might be explained due to the fact that the *M. hyopneumoniae* is capable of suppressing phagocyte activities of the alveolar macrophage, main pulmonary defense cell against infectious agents, causing immunodepression in the host. Furthermore, Ro and Ross (1983) verified that the lymphocytes of pigs infected with *M. hyopneumoniae* presented reduction in their ability to produce antibodies for non-related antigens. Ferreira and Sousa (2002) affirm that a specific microorganism can act over an animal’s general health status, causing immunodepression. Adegboye (1978) and Piffer et al. (1998) presented some evidences in which this phenomenon occurs with *M. hyopneumoniae*. Thanawongnuwech et

al. (2004) also attributed to the agent, the inhibition of neutrophil function, which could contribute to the development of secondary infections in the organism of these animals. Moreover, inflammatory reactions can lead to high production of pro-inflammatory cytokines by the macrophages resulting in a retarded pig growth, which can increase total condemnation during slaughter (WILKIE and MALLARD, 1999), as well as swine carriers of multifocal interstitial nephritis, usually called “white spotted” kidneys” (MARTÍNEZ et al., 2006).

Drolet and Dee (1999) affirm that the cases of interstitial nephritis can be induced by many bacterial and viral pathogens in pigs. Martínez et al. (2006) searched the main causing pathogens of nephritis in pigs with retarded growth and the authors conclude that none of the infectious agents detected could be directly attributed as the primary cause of nephritis (“White spotted” kidneys) in the animals analyzed. Maxie (1993) also adds that, since the lesions are not specific, it is rarely possible to attribute them to their etiological agent. So, Drolet et al. (2002) attributes the lesions caused by nephritis to a non-specific immunological response, prolonged in the place of antigenic stimulation and therefore, the potential infectious causes of nephritis in chronically affected pigs, can rarely be defined.

In this way, it can be presumed that the *M. hyopneumoniae* can cause immunodepression in pigs, predisposing it to nephritis.

## **Conclusion**

A positive association exists between PEP lung lesions and renal nephritis in pigs slaughtered in the western region of the State of Santa Catarina, Brazil.

**Acknowledgments** - The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil for financial support.

## References

- ADEGBOYE, D. S. A review of mycoplasma-induced immunosuppression. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.134, p.556-560, 1978.
- COSTA, M. M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: genes apxIVA e rDNA 16s. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e celular) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- DROLET, R.; D\_ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; RIBOTTA, M.; HIGGINS, R. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *Veterinary Record*, v.150, p.139–143, 2002.
- DROLET, R.; DEE, S.A. Diseases of the urinary system. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (Eds). *Diseases of Swine*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.966-967.
- FERREIRA, R. A.; SOUSA, A. V. O desenvolvimento do sistema imune de leitões e suas correlações com as práticas de manejo. *Boletim Agropecuário. Lavras*. v.39, p.1-39. 2002. Available at: <[http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol\\_46.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_46.pdf)>. Accessed February 24, 2007.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology*, v.100, p. 255-268, 2004.
- IRIGOYEN, L. F.; ALSTINE, W. V.; TUREK, J.; CLARK, L. K. Ultrastructural observation of the airways of recovered and susceptible pigs after inoculation with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n.1, p.1-7, 1998.



MARTÍNEZ, J.; JARO, P. J.; ADURIZ, G.; GÓMEZ, E. A.; PERIS, B.; CORPA, J. M. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *The Veterinary Journal*, v.174, n.1, p. 160-164, 2007.

MARTÍNEZ, J.; SEGALÉS, J.; ADURIZ, G.; ATXAERANDIO, R.; JARO, P.; ORTEGA, J.; PERIS, B.; CORPA, J. M. Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. *Research in veterinary science*, v.81, 92-98. 2006.

MAXIE, M. The urinary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds). *Pathology of Domestic Animals*. Vol.2. San Diego, Califórnia:Academic Press, 4th ed., 1993. p.447-538.

PIFFER, I. A.; PERDOMO, C. C.; SOBESTIANSKY, Y. Efeito de fatores ambientais na ocorrência de doenças. In: SOBESTIANSKY, Y.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S. *Suinocultura Intensiva: Produção, Manejo e Saúde do Rebanho*. Brasília: Embrapa-CNPQA, 1998. p.257-274.

RO, L. H.; ROSS, R. F. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. *American journal of veterinary research*, v.44, p. 2087-2094, 1983.

SCOFANO, A. S. Pneumonia enzoótica suína: diagnóstico anátomo-patológico, prevalência e efeitos sobre o desenvolvimento da carcaça. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BITAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESBROUCK, F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, v.109, p.20-36, 2005.

SUTER, M.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. *Infection and immunity*, v.49, p.615-620, 1985.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B.; HALBUR, P.; THACKER, E.L. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v.11, n.5, p.901–908, 2004.

TIMENETSKY, J. *Micoplasmas*. Universidade Federal de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. 2005. Available at: <[http://www.icb.usp.br/~bmm/bmm\\_dpto/pdfs/jorge.pdf](http://www.icb.usp.br/~bmm/bmm_dpto/pdfs/jorge.pdf)>. Accessed May 26, 2006.

THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004. p.159-292.

VAN ALSTINE, W. G.; STEVENSON, G. W.; KANITZ, C.L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 49, p.297-303, 1996.

WILKIE, B.; MALLARD, B. Selection for high immune response: an alternative approach to animal health maintenance? *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 72, p. 231-235, 1999.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *M. hyopneumoniae* foi detectado tanto em tecido pulmonar quanto em tecido renal, sendo comprovada a hipótese de que este agente pode ser detectado em tecido renal de suínos de terminação na ocasião do abate, tanto em rins com lesão quanto naqueles sem lesão. Entretanto, não se sabe se o mesmo pode ocasionar lesões. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre a patogenia renal de *M. hyopneumoniae*. Além disso, é necessário que seja verificada se a presença conjunta de PCV2 e de *M. hyopneumoniae* é uma associação sinérgica e capaz de provocar lesão, uma vez que nos animais portadores de lesões renais, estes dois agentes estavam relacionados. Não foi verificada a presença de *Leptospira* spp. nos rins analisados, descartando seu envolvimento como agente etiológico das lesões renais.

A concordância verificada entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária *post-mortem* com a histopatologia, entre o diagnóstico da Inspeção Sanitária com a IHQ e da histopatologia com a IHQ, permitiu concluir que quando os pulmões tem lesão macroscópica sugestiva de PES, a probabilidade de o resultado ser positivo na IHQ e a presença de lesões microscópicas aumenta. Assim, o diagnóstico para PES é factível porque está associado aos demais, de forma que o diagnóstico conferido pelos funcionários da Inspeção Sanitária nos matadouros não esteja equivocado, sendo o diagnóstico macroscópico um método válido para o diagnóstico de PES. Porém este não confirma a presença de *M. hyopneumoniae*.

As lesões microscópicas pulmonares influenciaram a espessura de gordura e o percentual de carne magra, porém não influenciaram o peso; as lesões

microscópicas renais e a presença de *M. hyopneumoniae* pela IHQ não influenciaram nenhuma das variáveis de desempenho analisadas, possivelmente pelo fato dos animais analisados terem sido vacinados contra este agente etiológico.

Apesar da expressiva detecção de DNA de PCV2, as lesões histopatológicas detectadas nos órgãos linfóides tonsila e linfonodo em suínos de terminação na ocasião do abate (depleção linfóide e folículos indistintos) foram brandas. Este quadro reflete a mudança no cenário de saúde de suínos com relação ao PCV2 após a adoção generalizada da vacinação dos rebanhos, de forma que a manifestação clínica da enfermidade atualmente é rara.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCS. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. Exportação Brasileira de Carne Suína. *Institucional e informações: relatório de atividades PNDS, 2012*. Disponível em: <[http://issuu.com/revistaabcs/docs/relatorio\\_web](http://issuu.com/revistaabcs/docs/relatorio_web)>. Acesso em: 09 março 2012.

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. *Estatísticas: mercado interno, mercado externo e mundial, 2012*. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 10 março 2012.

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

AHRENS, P.E; FRIIS, N.F. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe. *Letters in Applied Microbiology*, v.12, p.249-253, 1991.

ALLAN, G.M.; ELLIS, J. Porcine circovirus: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by coinfection of pigs with Porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, v.121, p.1-11, 1999.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MCMENAMY, M.; MCNAIR, I.; KRAKOWKA, S.G.; TIMMUSK, S.; WALLS, D.; DONNELLY, M.; MINAHIN, D.; ELLIS, J.; WALLGREN, P.; FOSSUM, C. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected farms in Ireland and Northern Ireland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.6, p.668-673, 2007.

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; JOHNSTON, D.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; FOSSUM, C.; WATTRANG, E.; WALLGREN, P. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV2. *Veterinary Record*, v.150, p.255-256, 2002.

ALLAN, G.M.; MEEHAN, B.; TODD, D.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ELLIS, J.; CLARK, E.G.; HARDING, J.; ESPUNA, E.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. Novel Porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record*, v.142, p.467-468, 1998.

ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; MCNULTY, M.S. Some biological and physicochemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B*, v.41, p.17-26, 1994.

AMEISEN, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation*, v.9, n.4, p.367-393, 2002.

AN, D.J., ROH, I.S., SONG, D.S., PARK, C.K., PARK, B.K. Phylogenetic characterization of Porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research*, v.129, p.115-122, 2007.

ANDREASEN, M.; MOUSING, J.; THOMSEN, L.K. No overall relationship between average daily weight gain and the serological response to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in eight chronically infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v.49, p.19-28, 2001.

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

ASAI, T.; OKADA, M.; YOKOMIZO, Y.; SATO, S.; MORI, Y. Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 51, p.325-331, 1996.

BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURÁN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, v.121, p.139-148, 1999.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* através da PCR em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999, Belo Horizonte-MG. *Anais...* Belo Horizonte, 1999, p.163-164.

BARCELLOS, D.E.; COELHO, C.F.; HERNIG, L.F. Experiência brasileira no controle da infecção por PCV2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 14, 2009, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia-MG, 2009, p.189-194.

BAUMEISTER, A.K.; RUNGE, M.; GANTER, M.; FEENSTRA, A.A.; DELBECK, F.; KIRCHHOFF, H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Pigs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.7, p.1984, 1988.

BEACH, N.M.; MENG, X. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, v.164, v.1-2, p.33-42, 2012.

BLANCHARD, A.; BROWING, G. *Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and strategies for control*. Wymondham Norfolk: Horizon Bioscience, 2005. 603p.

BLANCHARD, B.; KOBISCH, M.; BOVÉ, J.M.; SAILLARD, C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Molecular and Cellular Probes*, v.10, p.15–22, 1996.

BLANCHARD, P.; MAHE, D.; CARIOLET, R.; KERANFLEC'H, A.; BAUDOUARD, M.A.; CORDIOLI, P.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, v.21, p.4565–4575, 2003.

BLANCHARD, B., VENA, M.M., CAVALIER, A., LELANNIC, J., GOURANTON, J., AND KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *M. hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, v.30, p.329–341, 1992.

BOHER, P.B. Perspectivas da suinocultura no centro-oeste brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6, 1993, Goiânia, *Anais...Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos*, 1993, p. 29-32.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. *Suínos*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em 12 março 2012.

BUTTENSCHON, J.; FRIIS, N.F.; AALBAEK, B.; JENSEN, T.K.; IBURG, T.; MOUSING, J. Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. *Journal Veterinary Medicine – Series A: Physiology, Pathology and Clinical Medic*, n.44, p.271–280, 1997.

CALSAMIGLIA, M.; COLLINS, J.E.; PIJOAN, C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Veterinary Microbiology*, v.76, p.299-303, 2000.

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

CARMAN, S.; CAI, H.Y.; DELAY, J.; YOUSSEF, S.A.; MCEWEN, B.J.; GAGNON, C.A.; TREMBLAY, D.; HAZLETT, M.; LUSIS, P.; FAIRLES, J.; ALEXANDER, H.S.; VAN DREUMEL, T. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease - 2004-2006. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.72, p.259-268, 2008

CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.1390-1396, 2000.

CARUSO, I.; ROSS, R.F. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infectious on alveolar macrophage functions in swine. *American Journal Veterinary Research*, v.51, p.227-231, 1990.

CHAE, J.S.; CHOI, K.S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in Republic of Korea. *Research in Veterinary Science*, v.88, n.2, p.333–338, 2010.

CHEUNG, A.K.; LAGER, K.M.; KOHUTYUK, O.I.; VINCENT, A.L.; HENRY, S.C.; BAKER, R.B.; ROWLAND, R.R.; DUNHAM, A.G. Detection of two Porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of Virology*, v.152, p.1035-1044, 2007.

CHEUNG, A.K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, v.313, n.2, p.452–459, 2003.

CHIANINI, F.; MAJO, N.; SEGALLES, J.; DOMINGUEZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.94, p.63-75, 2003.

CHRISTENSEN, G.; SORENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, B. E. et al. (Eds.). *Diseases of swine*. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. cap. 61 p. 913-940.

CHOI C.; KIM J.; KANG I.J.; CHAE, C. Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Veterinary Record*, v.151, p.484-485, 2002.



CIACCI-ZANELLA, J.R. *Circoviridae*. In: FLORES, E.F. (Ed.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria:UFSM, 2007. Cap.13, p.363-374.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 5, p. 522-527, 2003

CIACCI-ZANELLA J. R.; MORÉS N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: MEMÓRIA DEL CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires, *Anais...* Buenos Aires, 2000, EIP16.

CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Ciência Rural*, v.36, p.1480-1485, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L.T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; ESTEVES, P.A. Detection of Porcine circovirus type 2 (PCV2) variants PCV-2-1 and PCV-2-2 in Brazilian pig population. *Research Veterinary Science*, v.87, p.157-160, 2009.

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

CLARK, E.G. Post-weaning syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, v.28, p.499-501, 1997.

CLARK, J. Mycoplasmas: identifying hosts for a stealth pathogen. *The Veterinary Journal*, v. 170, n.3, p.273-274, nov. 2005.

CLINE, G.; WILT, V.; DIAZ, E.; EDLER, R. Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Veterinary Record*, v.163, p.737-740, 2008.

CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da Pneumonia Enzoótica Suína. *Ciência Rural*, v.36, n.3, p.1034-1042, mai-jun. 2006.

CORTEY, M.; NAPP, S.; ALBA, A.; PILERI, E.; GRAU-ROMA, L.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Theoretical and experimental approaches to estimate the usefulness of pooled serum samples for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.23, n.2, p.233-240, 2011.

COSTA, M.M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: genes apxIVA e rDNA 16s. Porto Alegre, 2002. 81f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DARWICH, L.; MATEU, E. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, v.164, n.1-2, p. 61-67, 2012.

DARWICH, L.; PIE, S.; ROVIRA, A.; SEGALES, J.; DOMINGO, M.; OSWALD, I.P.; MATEU, E. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Genetic Virology*, v.84: p.2117-2125, 2003.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in the CD4+, CD8+, CD4/CD8 double positive cells and IgM+ cell subsets in peripheral blood mononuclear cells from postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age matched uninfected wasted and healthy pigs, correlates with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, p.236–242, 2002.

DARWICH, L.; SEGALES, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Archives of Virology*, v.149, p.857-874, 2004.

DARWICH, L.; SEGALES, J.; RESENDES, A.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; MATEU, E. Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with Porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Research in Veterinary Science*, v.84, p.194-198, 2008.

DEBEY, M.C.; JACOBSON, C.D.; ROSS, R.F. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p.1705-1710, 1992.

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

DEEN, J.; LARRIESTRA, A. Lost income in Grow/Finish: The problem of lightweight, cull and dead pigs. In: MANITOBA SWINE SEMINAR. *Proceedings...* 2004.

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

DONE, S.H. Enzootic pneumonia (Mycoplasmosis) revisited. *Pig Journal*, v.38, p.40-61, 1996.

DROLET, R.; THIBAUT, S.; D'ALLAIRE, S.; THOMSON, J.R.; DONE, S.H. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Journal of Swine Health Production*, v.7, p.283–285, 1999.

DUPONT, K.; NIELSEN, E.O.; BAEKBO, P.; LARSEN, L.E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case–control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, v.128, p.56–64, 2008.

EGGEN, A. A.; WITVLIET, M.; SCHMIDT, U.; RAES, M. One-dose vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2 In: IPVS CONGRESS, 21, 2010, Vancouver, Canada. *Proceedings....* 2010; p.110.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, v.39, p.44-51, 1998.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.11, p.3-14, 1999.

FANO, E.; PIJOAN, C.; DEE, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 69, p. 223–228, 2005.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. A chimeric Porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV-2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV-1 induces protective immunity against PCV-2 infection in pigs. *Journal of Virology*, v.78, p.6297-6303, 2004.

FINSTERBUSCH, T.; STEINFELDT, T.; DOBERSTEIN, K.; RODNER, C.; MANKERTZ, A. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. *Virology*, v.386, n.1, p.122-131, 2009.

FLECK, R.; SNELSON, H. Doenças respiratórias – Uma atualização nas medidas de controle do *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: II CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2004, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Anais... 2004. p. 55-58.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; DRIEMEIER, D.; MORES, N.; ZANELLA, J. Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, n.1, p.39-53, 2005.

FRANÇA T.N. Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. Seropédica, 2004. 110f. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2004.

FRISS, N.F. *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies. A survey. *Nordic Veterinary Medicine*, v.15, p.507-518, 1974.

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

GAGNON, C.A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P.; VENNE, M.H.; HOUDE, A.; ELAHI, S.M. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV2b) in swine in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, v.48, p.811–819, 2007.

GAUGER, P.C.; LAGER, K.M.; VINCENT, A.L.; OPRIESSNIG, T.; KEHRLI JR., M.E.; CHEUNG, A.K. Postweaning multisystemic wasting syndrome produced in gnotobiotic pigs following exposure to various amounts of porcine circovirus type 2a or type 2b. *Veterinary Microbiology*, v.153, n. 3–4, p.229–239, 2011.

GEBRUERS, F.; CALUS, D.; MAES, D.; VILLARREAL, I.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F. A set of four nested PCRs to detect different strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* in biological samples. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ORGANISATION FOR MYCOPLASMOLOGY, 17, 2008, Tianjin, China, *Proceedings...* 2008, p. 90.

GEORGAKIS, A.D.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KRITAS, S.K.; BALKAMOS, G.C.; KYRIAKIS, S.C. A study on the Porcine Respiratory Disease Syndrome (PRDC): Update review and proposed measures for its control. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, v.53, p.265-271, 2002.

GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p.1151-1163, 2009.

GIMENO, E.J. Fundamentos de Imunohistoquímica aplicada à Patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1995, p.17-51.

GOODWIN, R.F.W. The survival of *Mycoplasma suisipneumoniae* in liquid medium, on solid medium and in pneumonic tissue. *Research in Veterinary Science*, v.13, p.203-204, 1972.

GOODWIN, R.F.W.; POMEROY, A.P.; WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia in pigs with mycoplasma. *Veterinary Record*, v.77, p.1247-1249, 1965.

GRAU, A.F.; DEWEY, C.E.; FRIENDSHIP, B. Effect of pig management on weight in grower finisher pigs. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS ANNUAL MEETING, 32, 2001, Nashville, *Proceedings...* Nashville, USA, 2001, p.521-526.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, v.187, n.1, p.23–32, 2011.

GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Veterinary Microbiology*, v.119, n.2–4, p.144–151, 2007.

GUEDES, R.M.C. Diarréia em suínos de recria e terminação - Agentes infecciosos e o processo diagnóstico. In: SEMINÁRIO NOVARTIS LATINO AMERICANO SOBRE ILEÍTE E COLITE SUÍNA, 1, 2005, Foz do Iguaçu, *Anais...* Foz do Iguaçu, Paraná, 2005, p. 55-55.

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

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, v.72, p.5262-5267, 1998.

HANNAN, P.C.; BHOGAL, B.S.; FISH, J.P. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Reserach in Veterinary Science*, v.33, p.76-88, 1982.

HARASAWA, R.; KOSHIMIZU, K.; TAKEDA, O.; UEMORI, T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Molecular Cell Probes*, v.5, p.103-109, 1991.

HARDING, J.C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In: WESTERN CANADIAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1996, *Proceedings...* p. 21.

HARDING, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 27, 1997, *Proceedings...* p.503.

HARDING, J.C.; CLARK, E.G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Swine Health Production*, v.5, p.201–203, 1997.

HARMS, P.A.; HALBUR, P.G.; SORDEN, S.D. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health Production*, v.10, n.1, p.4, 2002.

HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.R.; LAGER, K.M.; MAROZOV, I.; PAUL, P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*, v.38, p.528-539, 2001.

HA, Y.; JUNG, K.; CHAE, C. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. *Veterinary Record*, v.156 n.12, p.383–384, 2005.

HENDERSON, B.; POOLE, S., WILSON, M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiology reviews*, v.60, p.316-341, 1996.

HISCOTT, J. Introduction-cytokine receptors, signaling pathways and viruses. *Cytokine Growth Factor Review*, v.12, n.2-3, p.129-31, 2001.

HORLEN, K.P.; DRITZ, S.S.; NIETFELD, J.C.; HENRY, S.C.; HESSE, R.A.; OBERST, R.; HAYS, M.; ANDERSON, J.; ROWLAND, R.R. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.232, p.906-912, 2008.

HUANG, L.; LU, Y.; WEI, Y.; GUO, L.; LIU, C. Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against porcine circovirus type 2. *Journal of Virological Methods*, v.171, n.1, p.26–33, 2011.

HURNIK, D.; HANNA, P.E.; DOHOO, I.R. Evaluation of rapid gross visual appraisal of swine lungs at slaughter as a diagnostic screen for enzootic pneumonia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.57, p.37-41, 1993.

HURNIK, J. F. Animal responses to the environment. In: PHILIPS, C; PIGGINS, D. (Ed.). *Behaviour in Farm Animals and their Environment*. Wallingford: C.A.B. International Publishers, U.K, 1992.

JACOBSEN, B., KRUEGER, L., SEELIGER, F., BRUEGMANN, M., SEGALÉS, J., BAUMGAERTNER, W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary Microbiology*, v.138 n.1–2, p.27–33, 2009.

JACQUES, M.; BLANCHARD, B.; FOIRY, B.; GIRARD, C.; KOBISCH, M. *In vitro* colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Annales de Recherches Veterinaires*, n. 23, p.239–247, 1992.

JENKINS, C.; WILTON, J.L.; MINION, F.C.; FALCONER, L.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infectious Immunology*, v.74, p.481-487, 2006.

JIRAWATTANAPONG, P.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; VAN LEENGOED, L.; WISSELINK, H.; RAYMAKERS, R.; CRUIJSEN, T.; VAN DER PEET-SCHWERING, C.; NIELEN, M.; VAN NES, A. Pleuritis in slaughter pigs: relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. *Research in Veterinary Science*, v.88, p.11-5, 2010.

KARUPPANNAN, A.K.; JONG, M.H.; LEE, S.H. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 2008.

KHAYAT, R.; BRUNN, N.; SPEIR, J.A.; HARDHAM, J.M.; ANKENBAUER, R.G.; SCHNEEMANN, A.; JOHNSON, J.E. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, v.85, p.7856–7862, Erratum in: *Journal of Virology*, 2011, v.85, p.11542, 2011.

KIM, J.; CHUNG, H.K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*, v.166, p.251-256, 2003.

KIM J.; CHUNG H.K.; JUNG T.; CHO W.S.; CHOI C.; CHAE C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, n.1, p.57-62, 2002.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record*, v.155, p.489-492, 2004.

KING, D.; DUBOIS, P.; PAINTER, T.; HOLCK., T.; EDLER, R.; JOHNSON, C.; DIAZ, E. Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination. American Association of Swine Veterinarians, p. 159-161, 2008. Disponível em:

[http://www.flexcombo.com/library/documents/Papers/AASV\\_2008 - King - CircoFLEX - Subclinical - Carg.pdf](http://www.flexcombo.com/library/documents/Papers/AASV_2008_-_King_-_CircoFLEX_-_Subclinical_-_Carg.pdf). Acesso em 17 setembro 2011.

KENNEDY, S., MOFFETT, D., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., ELLIS, J., KRAKOWKA, S., ALLAN, G.M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with Porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, v.122, p. 9-24, 2000.

KENNEDY, S.; SEGALES, J.; ROVIRA, A.; SCHOLE, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.15, p.151-156, 2003.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; OGLESBEE, M.; ALLDINGER, S.; ALLAN, G. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Veterinary Pathology*, v.41, n.5, p.471-481, 2004.

KRAKOWKA, S.; HARTUNIAN, C.; HAMBERG, A.; SHOUP, D.; RINGS, M.; ZHANG, Y.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *American Journal of Veterinary Research*, v.69, p.1615-1622. 2008.

KURTH, K.T.; HSU, T.; SNOOK, E.R.; THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; MINION, F.C. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, p.463-469, 2002.

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

LAGER, K.M.; GAUGER, P.C.; VINCENT, A.L.; OPRIESSNIG, T.; KEHRLI J.R.; CHEUNG, A.K. Mortality in pigs given porcine circovirus type 2 subgroup 1 and 2 viruses derived from DNA clones. *Veterinary Record*, v.161, p.428-429, 2007.

LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M., *et al.* Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 80, p. 69-75, 1999.

LE CARROU, J.; LAURENTIE, M.; KOBISCH, M.; GAUTIER-BIUCHARDON, A.V. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* Gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 50, n.6, p. 1959-1966. 2006.



LEKCHAROENSUK, P.; MOROZOV, I.; PAUL, P.S.; THANGTHUMNIYOM, N.; WAJJAWALKU, W.; MENG, X.J. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*, v.78, n.15, p.8135–8145, 2004.

LENEVEU, P.; ROBERT, N.; KEÏTA, A.; PAGOT, E.; POMMIER P.; TESSIER, P. Lung lesions in pigs at slaughter: a 2-year epidemiological study in France. *International Journal Applied Research Veterinary Medicine*, v.3, p.259–265, 2005.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, v. 79, n. 13, p. 8262–8274, 2005.

LIUM, B.M.; FALK, K. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. *Acta Veterinaria Scandinavia*, v.32, p.55-65, 1991.

LI, Y.Z.; HO, Y.P.; CHEN, S.T.; CHIOU, T.W.; LI, Z.S.; SHIUAN, D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Moscow)*, v.74, p.215-220, 2009.

MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X.J.; OPRIESSNIG, T. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with Porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, v.46, p.707-716, 2009.

MADSON, D.M.; RAMAMOORTHY, S.; KUSTER, C.; PAL, N.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, n.6, p.725–734, 2008.

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

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

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

MAHÉ, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C.; ARNAULD, C.; LE CANN, P.; CARIOLET, R.; MADEC, F.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Differential recognition of ORF2

protein from type 1 and 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of Genetic Virology*, v.81, p.1815-1824, 2000.

MANKERTZ, A.; CALISKAN, R.; HATTERMANN, K.; HILLENBRAND, B.; KURZENDOERFER, P.; MUELLER, B.; SCHMITT, C.; STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.81–88, 2004.

MANKERTZ, A.; MUELLER, B.; STEINFELDT, T.; SCHMITT, C.; FINSTERBUSCH, T. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *Journal of Virology*, v.77, n.18, p.9885–9893, 2003.

MARÉ, C.J. SWITZER, W.P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary Medicine*, v.60, p.841-846, 1965.

MAROIS, C.; LE CARROU, J.; KOBISCH, M.; GAUTIER-BOUCHARDON, A.V. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology*, n.120, p.96–104, 2007.

MATEUSEN, B.; MAES, D.G.; VAN SOOM, A.; LEFEBVRE, D.; NAUWYNCK, H.J. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology*, v.68, p.896-901, 2007.

MATTSSON, J. G.; BERGSTOM, K.; WALLGREN, P.; JOHANSSON, E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S RNA gene. *Journal of Clinic Microbiology*, v.33, p.893-897, 1995.

MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J.C.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virology Methods*, v.80, n.2, p.123–128, 1999.

MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; O'CONNOR, M.; BROCKBANK, S.; GILPIN, D.; LASAGNA, C.; BORIOSI, G.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, n.2, p.106–112, 2002.

MCNULTY, M.; DALE, J.; LUKERT, P.; MANKERTZ, A.; RANGLES, J.; TODD, D.; Circoviridae. In: VAN REGERMONTTEL, M.H.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H. (Ed.)

Seventh report of the International Report Committee on Taxonomy Viruses. Academic Press, San Diego, 2000.

MEEHAN, B.M.; CREELAN, J.L.; MCNULTY, M.S.; TODD, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *Journal of Genetic Virology*, v.78, n.1, p.221-227, 1997.

MEEHAN, B.M., MCNEILLY, F., TODD, D., KENNEDY, S., JEWHRST, V.A., ELLIS, J.A., HASSARD, L.E., CLARK, E.G., HAINES, D.M., ALLAN, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of Genetic Virology*, v.79, n.9, p.2171-2179, 1998.

MENG, X. Spread like a wildfire - The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs. *Virus Research*, v.164, p.1-3, 2012.

MESSIER, S., ROSS, R.F. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, p.1497-1502, 1991.

MILES, R.J.; TAYLOR R.R.; VARSANI, H. Oxygen uptake and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by fermentative *Mycoplasma* spp. *Journal of Medic Microbiology*, v.34, p.219–223, 1991.

MINION, F.C.; LEFKOWITZ, E.J.; MADSEN, M.L.; CLEARY, B.J.; SWARTZELL, S.M.; MAHAIRAS, G.G. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology*, v.186, p.7123-7133, 2004.

MISINZO, G.; DELPUTTE, P.L.; MEERTS, P.; LEFEBVRE, D.J.; NAUWYNCK, H.J. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *Journal of Virology*, v.80, n.7, p.3487–3494, 2006.

MORES, N. Impacto econômico da circovirose na produção de suínos. In: V SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS – AVESUI, 5, 2005, Florianópolis, *Anais...* Florianópolis, Santa Catarina, 2005, p.9-13.

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; MORGAN, M.K.; YOON, K.J.; PAUL, P.S. Detection of a novel strain of Porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinic Microbiology*, v.36, p.2535-2541, 1998.

MORRIS, C.R.; GARDNER, I.A.; HIETALA, S.K.; CARPENTER, T.E.; ANDERSON, R.J.; PARKER, K.M. Seroepidemiologic study of natural transmission of

*Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 21, p. 323-337, 1995.

MORRISON, R.B.; PIJOAN, C.; HILLEY, H.D.; RAPP, V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.49, p.129-137, 1985.

MUNETTA, Y.; MINAGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; NAGATA, R.; MARKHAM, P.; BROWNING, G.; MORI, Y. IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Interferon Cytokine Research*, v.26, p.637-644, 2006.

MUNETTA, Y.; MINAGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; OGAWA, Y.; HIKONO, H.; MORI, Y. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.70, p.1065-1070, 2008.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of Genetic Virology*, v.81, p.2281-2287, 2000.

NOGUEIRA, R.H.G. Micoplasmose pulmonar no suíno. In: III ENCONTRO DE MÉDICOS VETERINÁRIOS DO NORDESTE, 1996, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa, 1996. 19p.

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

OBOEGBULEN, S.I. Enzootic pneumonia of pigs: a review. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, v.29, p.269-274, 1981.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*, v.42, p.551-553, 2001.

OLIVEIRA, R. C. Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA. São Paulo, 2008. 138f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OPRIESSNIG, T.; MCKEOWN, N.E.; ZHOU, E.M.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Genetic and experimental comparison of Porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates

from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of Genetic Virology*, v.87, p.2923-2932, 2006a.

OPRIESSNIG, T.; FENAUX, M.; THOMAS, P.; HOOGLAND, M.J.; ROTHSCHILD, M.F.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Veterinary Pathology*, v.43, p.281–293, 2006b.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.-J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, p.591-615, 2007.

OSTANELLO, F.; DOTTORI, M.; GUSMARA, C.; LEOTTI, G.; SALA, V. 2007. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *Journal of Veterinary Medicine A - Physiology and Pathology Clinical Medicine*, v.54, p.70-75, 2007.

PATTERSON, A.R.; BAKER, R.B.; MADSON, D.M.; PINTAR, A.L.; OPRIESSNIG, T. Disinfection protocols reduce the amount of porcine circovirus type 2 in contaminated 1:61 scale model livestock transport vehicles. *Journal of Swine Health Production*, v.19, n.3, p.156–164. 2011.

PATTERSON, A.R.; JOHNSON, J.; RAMAMOORTHY, S.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays to detect Porcine circovirus-2 (PCV2)-specific antibodies after vaccination or inoculation of pigs with distinct PCV-1 or PCV-2 isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, n.6, p.744–751, 2008.

PESCADOR C.; ROZZA D.B.; ZLOTOWSKI P.; BOROWSKI S.M.; BARCELLOS D.E.S.N.; DRIEMEIER D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS -ABRAVES, 11, 2003, Goiânia, *Anais...* Goiânia, 2003, p.105-106.

PIETERS, M.; PIJOAN, C.; FANO, E.; DEE, S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.261-266, 2009.

POLLACK, J. D. Central carbohydrate pathways: metabolic flexibility and the extra role of some housekeeping“ enzymes. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R (Ed.). *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York: Kluwer, 2002, p. 163–201.

QUINTANA, J.; SEGALES, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.;

PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*, v. 149, p.357-361, 2001.

RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Animal Health Research Reviews*, v.10, n.1, p.1–20, 2008.

RAUTIAINEN, E.; VIRTALA, A.M.; WALLGREN, P.; SALONIEMI, H. Varying Effects of Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the Weight Gain Recorded in Three Different Multisource Fattening Pig Herds. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 47, p. 461-469, 2000.

RAUTIAINEN, E.; WALLGREN, P. Aspects of the Transmission of Protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* from Sow to Offspring. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 48, p. 55-65, 2001.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. *Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers, 2002. 572p.

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

RIBEIRO, F.C.; SILVA, J.C.P.; SANTOS, J.L.; PONTES, K.C.S. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.6, p.709-714, 2004.

RICE, P.; HOUSHAYMI, B.M.; ABU-GROUN, E.A.; NICHOLAS, R.A.; MILES, R.J. Rapid screening of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of European subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. *Veterinary Microbiology*, v. 78, p.343-351, 2001.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; ROVIRA, A.; PUJOLS, J.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Retrospective study on Porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Disease and Veterinary Public Health*, v. 50, p.99-101, 2003.

RODRIGUEZ, F.; RAMIREZ, G.A.; SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; LORENZO, H.; Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology*, v.130, p.306-312, 2004.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K.S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies

of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, v.120, p.59-78, 1999.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; ROVIRA, A.; DOMINGO, M. Porcine circovirus in Spain. *Veterinary Record*, v.146, v.20, p.591–592, 2000a.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A.; FOLCH, J.M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M.; DURAN, C.O.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*, v.146, p.40-43, 2000b.

ROSE, N.; OPRIESSNIG, T.; GRASLAND, B.; JESTIN, A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, v.164, p.78-89, 2012.

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

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

SAAB, M.S.M.; CLÁUDIO, L.G. A cadeia produtiva da carne suína no Brasil, 2010. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/administracao/artigos/cadeia-produtiva-carne-suina-t235/124-p0.htm>>. Acesso em: 01 março 2012.

SARLI, G.; MANDRIOLI, L.; LAURENTI, M.; SIDOLI, L.; CERATI, C.; ROLLA, G.; MARCATO, P.S. Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 83, p.53–67, 2001.

SARRADELL, J.; ANDRADA, M.; RAMIREZ, A.S.; FERNANDEZ, A.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; JOVER, A.; LORENZO, H.; HERRAEZ, P.; RODRIGUEZ, F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Pathology*, v.40, p.395-404, 2003.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, v.6, n.2, p.119–142, 2005.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJO, N.; DOMINGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunossuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.151-158, 2004.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, v.24, p.109-124, 2002.

SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record* v.162, p.867–868, 2008.

SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E.M.; ESPUNA, E.; DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record*, v.142, n.18, p.483–486, 1998.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Veterinary Research*, v.164, p.10-19, 2012.

SHANG, S.B.; JIN, Y.L.; JIANG, X.T.; ZHOU, J.Y.; ZHANG, X.; XING, G.; HE, J.L.; YAN, Y. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Molecular Immunology*, v.46, n.3, p.327–334, 2009.

SHIBAHARA, T.; SATO, K.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, p.1125–1131, 2000.

SIBILA, M., BERNAL, R., TORRENTS, D., RIERA, P., LLOPART, D., CALSAMIGLIA, M., SEGALÉS, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology*, v.127, p.165-170, 2008.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*, v.181, p.221-231, 2009.

SIBILA, M.; NOFRARIAS, M.; LOPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; VALERO, O.; ESPINAL, A.; CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary Microbiology*, v.122, p.97-107, 2007.

SIMÃO, G.M.R. Doença subclínica associada ao porcine circovirus-2 (PCV2) em rebanho suíno: avaliação sorológica, histopatológica e quantificação viral. Viçosa, 2010. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. Disponível em:



[http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/8/TDE-2010-07-16T100507Z-2451/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/8/TDE-2010-07-16T100507Z-2451/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acessado em: 01/2012.

SIRINARUMITR, T.; MOROZOV, I.; NAWAGITGUL, P.; SORDEN, S.D.; HARMS, P.A.; PAUL, P.S. Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p.562-565, 2000.

SMITH, W.J.; THOMSON, J.R.; DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, v.132, p.47, 1993.

SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO JÚNIOR, P.; HIROSE, F.; MATOS, M. *Pneumonia Enzoótica suína: prevalência, impacto econômico, fatores de risco e estratégias de controle*. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 2001. 44p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, S. (Ed.). *Clínica e patologia suína*. 2 ed. Goiânia, 1999, 464p.

SOBESTIANSKY, J. PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R. *Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção do estado de Santa Catarina*. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPSA, 1987. 5p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 123).

SORDEN, S. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Production*, v.8, n.3, p.133–136, 2000.

SORENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; FEENSTRA, A.A.; FELD, N.C.; FRIIS, N.F.; BILLE-HANSEN, V.; JENSEN, N.E.; PEDERSEN, M.W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology*, v. 54, p. 23-34, 1997.

STÄRK, K.D.; NICOLET, J.; FREY, J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied Environmental Microbiology*, v.25, p.327-330, 1998.

STEINER, E.; BALMELLI, C.; GERBER, H.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. Cellular adaptive immune response against Porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Veterinary Research*, v.5, p.45, 2009.

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

STEMKE, G.W. Gene amplification (PCR) to detect and differentiate mycoplasmas in porcine mycoplasmal pneumonia. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.327-330, 1997.

STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K.; CHOI, J.; LATIMER, K.S.; KANITZ, C.L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, n.1, p.57–62, 2001.

STEVENSON, L.S.; GILPIN, D.F.; DOUGLAS, A.; *et al.* T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*, v.20, n.3, 2007.

STRAIT, E.L.; MADSEN, M.L.; MINION, F.C.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; DAMMEN, M.; JONES, K.R.; THACKER, E.L. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, p.2491-2498, 2008.

STRAW, B.E.; DALLAIRE, S.D.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (eds). *Disease of Swine*. 8 ed. Ames (IA):Iowa State University Press, 1999.

SUN, S.Q.; GUO, H.C.; SUN, D.H.; YIN, S.H.; SHANG, Y.J.; CAI, X.P.; LIU, X.T. Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2. *Virology Journal*, v.7, n.274, 2010.

SZEREDI, L.; SZENTIRMAI, C. Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.56, n.1, p.101–109, 2008.

TAJIMA, M.; YAGIHASHI, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity*, v.37, n.3, p.1162-1169, 1982.

TANG, Y.W.; POCOP, G.W.; PERSING, D.H. Molecular diagnostic of infectious diseases. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 43, n. 11, p. 2021-2038, 1997.

THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews*, v.5, n.2, p.317-320, 2004.

THACKER, E.L.; HALBUR, P.G.; ROSS, R.F.; THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B.J. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. *Journal of Clinical and Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 620–627, mar. 1999a.

THACKER, E.L.; HALBUR, P.G.; THACKER, B.J. Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, *Proceedings...* 1999b. p.375-377.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B.; HALBUR, P.; THACKER, E.L. Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 11, n. 5, p. 901–908, set. 2004.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, v.226, p.153-167, 1974.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, v. 295, p.64-66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, v.91, p.271-276, 1986.

TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S.; GERMANN, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Archives of Virology*, v.140, p.737-743, 1995.

TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology*, v.96, p.39-57, 1987.

TODD, D.; BENDINELLI, M.; BIAGINI, P.; HINO, S.; MANKERTZ, A.; MISHIRO, S.; NIEL, C.; OKAMOTO, H.; RAIDAL, S.; RITCHIE, B.W.; TEO, G.C. *Circoviridae*. In: FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 327–334, 2005.

VAN ALSTINE, W.G.; STEVENSON, G.W.; KANITZ, C.L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Veterinary Microbiology*, v.49, p.297-303, 1996.

VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, v.187, p.5568-5577, 2005.

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

VILLARREAL, I. Epidemiology of *M. hyopneumoniae* infections and effect of control measures. Belgium, 2010. 221f. Tese (Doutorado), Ghent University, Belgium, 2010.

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

WANG, S.; FRAPPIER, L. Nucleosome assembly proteins bind to Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 and affect its functions in DNA replication and transcriptional activation. *Journal of Virology*, v.83, n.22, p.11704–11714, 2009.

WEI, L.; KWANG, J.; WANG, J. Porcine circovirus type 2 induces the activation of nuclear factor kappa B by I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *Virology*, v.378, p.177-184, 2008.

WELLENBERG, G.J.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; DE JONG, M.F.; BOERSMA, W.J.; ELBERS, A.R. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case–control study. *Veterinary Microbiology*, v. 99, n.3–4, p.203–214, 2004.

WIEDERKEHR, D.D.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; HAESSIG, M.; ZIMMERMANN, D.; POSPISCHIL, A.; BRUGNERA, E.; SIDLER, X. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v.136, p.27–35, 2009.

WILTON, J.; JENKINS, C.; CORDWELL, S. J.; FALCONER, L.; MINION, F. C.; ONEAL, D. C.; DJORDJEVIC, M. A.; CONNOLLY, A.; BARCHIA, I.; WALKER, M. J.; DJORDJEVIC, S. P. *Molecular Microbiology*, n. 71, 566–582, 2009.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R; CITTI, C. *In vitro* cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infectious Immunology*, v.68, p.4238-4244, 2000.

YAMAGUTI, M. Detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela reação em cadeia da polimerase (Nested-PCR) em suínos com problemas respiratórios. Londrina, 2003. 62f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2003.

YAMAGUTI, M.; MULLER, E.E.; PIFFER, A.I.; KICH, J.D.; KLEIN, C.S.; KUCHIISHI, S.S. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39. n.3, p.471-476, 2008.

YAMAGUTI, M. Isolamento de micoplasmas de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA. São Paulo, 2009. 145f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

YOUNG, M.G.; CUNNINGHAM, G.L.; SANFORD, S.E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *Journal of Swine Health and Production*, v.19, n.3, p.175-180, 2011.

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

## **6 APÊNDICE**

### **6.1 BIOSCIENCE JOURNAL**

**PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA: RELATIONSHIP BETWEEN  
MICROSCOPIC LUNG AND KIDNEY LESIONS IN SANTA CATARINA,  
BRAZIL**

*PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA: RELAÇÃO ENTRE LESÕES MICROSCÓPICAS  
PULMONARES E RENAS EM SANTA CATARINA, BRASIL*

**Kênia de Fátima CARRIJO<sup>1</sup>; Elmiro Rosendo do NASCIMENTO<sup>2</sup>; Rogerio TORTELLY<sup>3</sup>**

1. Médica Veterinária, Mestre e Doutoranda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói, RJ, Brasil. [keniafcarrijo@yahoo.com.br](mailto:keniafcarrijo@yahoo.com.br); 2. Professor, Doutor, Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária - UFF, Niterói, RJ, Brasil. [elmiro@vm.uff.br](mailto:elmiro@vm.uff.br); 3. Professor, Doutor, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária - UFF, Niterói, RJ, Brasil. [rtortel@microlink.com.br](mailto:rtortel@microlink.com.br)

**ABSTRACT:** In this work the relationship between lung lesions of pigs with Enzootic Pneumonia and kidney lesions during sanitary inspection at slaughter was investigated. For this purpose sixty-nine Enzootic Pneumonia positive lung samples and sixty-nine negative ones as well as kidneys from the same pigs were *post mortem* examined. Microscopic examination revealed that 54.28% of the pigs (58/138) had both lesions, an association significant by Chi-square ( $P < 0.05$ ). The intensity of this association, by "Odds ratio" value of 0.2267 was also significant (0.09045-0.5683). Such result indicates that Porcine Enzootic Pneumonia positive pigs are more likely to develop nephritis. Although the relationship between lesions is uncertain, immunodepression caused by Porcine Enzootic Pneumonia is a probable cause of the concomitant renal disease.

**KEYWORDS:** Porcine Enzootic Pneumonia. Nephritis. Swine slaughtered. Refrigerated slaughterhouses.

## INTRODUCTION

One of the biggest problems faced by the pig industry, worldwide, are the diseases that involve the respiratory system of these animals (STAKENBORG et al., 2005). Among the main microorganisms involved in Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC), stands out *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of the Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) or Porcine Mycoplasmal Pneumonia (COSTA, 2002).

After inhalation, the *M. hyopneumoniae* primarily attacks the ciliated epithelium of the trachea, bronchi and bronchiole, and subsequently, causes damage to the ciliated epithelium cells by adhering to the superficial walls of the cilium and epithelium (HAESEBROUCK et al., 2004). The functional alterations of these structures can lead to adverse consequences, provoking suppressing effects in the alveolar macrophages, which are the main cells of the immunological pulmonary defense against infectious agents (TIMENETSKY, 2005), causing immunodepression (ADEGBOYE, 1978). As a consequence of immunodepression, there is a decrease in the resistance to other infectious agents, causing secondary infections (SUTER et al., 1985).

Wilkie and Mallard (1999) reported that, besides the highly probable immunodepression caused by the *M. hyopneumoniae*, the production of

high levels of pro-inflammatory cytokines by the macrophages is capable of causing decrease on growth rate, resulting in a retarded pig growth. The percentage of condemnation during slaughter of these animals is much higher than in apparently healthier ones (MARTÍNEZ et al., 2007). As pointed out, slaughtered swines with multifocal interstitial nephritis (usually called "white spotted" kidneys) also present lower growth. The main causing pathogens of nephritis in pigs were searched and none of the infectious agents detected could directly be assigned as the primary cause of nephritis studied (MARTÍNEZ et al., 2006).

Even though the relationship between lung and kidney lesions in the literature is not clear, it has been observed a rather high prevalence of kidney lesions in pigs with lung lesions characteristic of PEP in the Jefferson Andrade dos Santos Pathological Anatomy Laboratory of the Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil (Rogerio Tortelly, "Personal Communication"). Moreover, there is no information in the literature linking lung and kidney lesions in the same animal.

As pointed out, the present study had the objective of statistically analyze the association between lung ascribed as PEP and kidney lesions in slaughtered swine, under sanitary inspection.



## MATERIAL AND METHODS

In the present study, lungs and kidneys samples of 138 pigs from the Western region of the State of Santa Catarina, Brazil, slaughtered under Official Sanitary Inspection were used. These pigs were about five to six months of age and had an average warm carcass weight of 84.33 Kg.

Out of those 138 pigs, 69 were assigned positive for PEP while 69 had no apparent lung lesions, as diagnosed by the Official Inspection Service. After the alternated collection of positive and negative lung fragments for PEP, kidneys fragments from the same pigs were collected, and identified accordingly.

Lung and kidney fragments were individually stored in plastic flasks, properly name-tagged, containing 10% formaldehyde solution and then sent to the Jefferson Andrade dos Santos Pathological Anatomy Laboratory of the "Universidade Federal Fluminense" (Federal Fluminense University), where they were processed according to routines techniques, waxed and stained with Haematoxylin-Eosin.

In the microscopic diagnosis of PEP cases was based on the *score* classification criteria described by Van Alstine et al. (1996), Irigoyen et al. (1998) and Scofano (2006). Score zero, absence of lesion, including peribronchial mononuclear nodules; score 1, when small nodules were present in less than 25% of the bronchi, bronchioles and vessels; score 2, when small nodules were present in more than 25% of these same tissues and score 3, when they were present in over 75% of the structures or due to the presence of larger nodules. Lungs with microscopic scores 0 and 1 were presumptively considered negative for PEP while

those with microscopic scores 2 and 3, were considered positive.

In the microscopic examination of the renal tissue, the cases were considered positive in the presence of alterations on the parenchyma, such as inflammatory infiltrate of mononuclear constitution (nephritis), which could have a focal or multifocal distribution and localization interstitial, perivascular or periglomerular. The cases without renal tissue alterations were considered negative.

After data collecting, all information were transferred to a data bank for further statistical analysis at 5% level. The Chi-square test was used to test the frequency between renal and lung lesions by microscopy (positive and negative) and nephritis. Chi-squared was also used to verify the association between lung lesions scores (0, 1, 2 and 3) and the nephritis diagnosis (positive and negative) (THRUSFIELD, 2004).

## RESULTS

Results on lung lesions score association and nephritis are described on Tables 1 and 2. On table 1, where lung lesions scores and nephritis were microscopically associated, we could notice that only 21.21% of the animals with negative diagnosis for nephritis presented positivity for PEP. However, 57 pigs, 54.28% concomitantly, had the two injuries, being this association significant by Chi-square ( $P < 0.05$ ). The "Odds Ratio" obtained was small 0.2267 (0.09045-0.5683), but significant. On table 2, this association in relation to lung score lesions was also obtained by the chi-square ( $P < 0.05$ ) which implies that as lung lesion scores increase, more nephritis are encountered.

**Table 1.** Relationship between lung and kidney lesions in pigs slaughtered under Official Sanitary Inspection, according to Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) microscopic diagnosis<sup>a</sup>, in Western region of the state of Santa Catarina, Brazil, March, 2007.

Nephritis	Microscopic Diagnosis PEP		Total (%)
	Negative (%)	Positive (%)	
Positive	48 (45.71)	57 (54.8)	105 (100)
Negative	26 (78.78)	07 (21.21)	33 (100)
<b>TOTAL</b>	<b>74 (53.62)</b>	<b>64 (46.37)</b>	<b>138 (100)</b>

<sup>a</sup> Chi-Square significant ( $P=0.0018$ ); OR: 0.2267 (0.09045-0.5683) also significant.



**Table 2.** Relationship between lung and kidney lesions, in pigs slaughtered under Official Sanitary Inspection according to Porcine Enzootic Pneumonia (PEP) lung lesion score<sup>a</sup>, in Western region of the state of Santa Catarina, Brazil, March, 2007.

Nephritis	PE Microscopic Score				Total (%)
	0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
Positive	28 (26.66)	20 (19.04)	16 (15.23)	41 (39.04)	105 (100)
Negative	13 (39.39)	13 (39.39)	03 (9.09)	04 (12.12)	33 (100)
<b>TOTAL</b>	<b>41 (29.71)</b>	<b>33 (23.91)</b>	<b>19 (13.77)</b>	<b>45 (32.60)</b>	<b>138 (100)</b>

<sup>a</sup>Chi-square significant (P < 0.05)

## DISCUSSION

Results from this work show for the first time that pigs with PEP characteristic lesions (microscopic scores 2 and 3) are more likely to develop nephritis. According to the "Odds Ratio" (OR) obtained it can be stated that pigs with PEP lesions were at a 2.3 higher risk of developing nephritis higher than pigs without lung lesions.

This relationship might be explained due to the fact that the *M. hyopneumoniae* is capable of suppressing phagocyte activities of the alveolar macrophage, main pulmonary defense cell against infectious agents, causing immunodepression in the host.

Ro and Ross (1983) verified that the lymphocytes of pigs infected with *M. hyopneumoniae* presented reduction in their ability to produce antibodies for non-related antigens. Ferreira and Sousa (2002) affirm that a specific microorganism can act over an animal's general health status, causing immunodepression. Adegboye (1978) and Piffer et al. (1998) presented some evidences in which this phenomenon occurs with *M. hyopneumoniae*. Thanawongnuwech et al. (2004) also attributed to the agent, the inhibition of neutrophil function, which could contribute to the development of secondary infections in the organism of these animals.

Inflammatory reactions can lead to high production of pro-inflammatory cytokines by the macrophages resulting in a retarded pig growth, which can increase total condemnation during slaughter (WILKIE; MALLARD, 1999), as well as swine carriers of multifocal interstitial nephritis, usually called "white spotted" kidneys" (MARTÍNEZ et al., 2006).

Drolet and Dee (1999) affirm that the cases of interstitial nephritis can be induced by many bacterial and viral pathogens in pigs. Martínez et al. (2006) searched the main causing pathogens of nephritis in pigs with retarded growth and the authors conclude that none of the infectious agents detected could be directly attributed as the primary cause of nephritis ("White spotted" kidneys) in the animals analyzed. Maxie (1993) also adds that, since the lesions are not specific, it is rarely possible to attribute them to their etiological agent. So, Drolet et al. (2002) attributes the lesions caused by nephritis to a non-specific immunological response, prolonged in the place of antigenic stimulation and therefore, the potential infectious causes of nephritis in chronically affected pigs, can rarely be defined.

In this way, it can be presumed that the *M. hyopneumoniae* can cause immunodepression in pigs, predisposing it to nephritis.

## CONCLUSION

A positive association exists between PEP lung lesions and renal nephritis in pigs slaughtered in the western region of the State of Santa Catarina, Brazil.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil for financial support.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre lesões pulmonares de Pneumonia Enzoótica e renais pelo Serviço de Inspeção Sanitária em suínos abatidos. Foram utilizadas amostras de pulmões com lesão de pneumonia enzoótica de 69 suínos e amostras negativas de igual quantidade de animais. Foram coletados também amostras de rins dos 138 suínos estudados. O exame microscópico dos suínos com e sem lesão pulmonar revelou que 54,28% (57/138) estavam concomitantemente com lesões nos pulmões e rins, sendo esta associação significante pelo Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ). A intensidade desta associação por "Odds ratio" foi de 0,2267, também significante (0,09045-0,5683). Pôde-se concluir que existe associação entre lesões pulmonares e renais, significando que animais com lesões presuntivas de pneumonia enzoótica têm maior predisposição para desenvolverem um quadro de nefrite.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pneumonia enzoótica suína. Nefrite. Suínos de abate. Matadouro-frigorífico.

## REFERENCES

- ADEGBOYE, D. S. A review of mycoplasma-induced immunosuppression. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 134, n. 6, p. 556-560, 1978.
- COSTA, M. M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: genes *apxIVA* e *rDNA 16s*. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- DROLET, R.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; RIBOTTA, M.; HIGGINS, R. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 5, p. 139-143, 2002.
- DROLET, R.; DEE, S.A. Diseases of the urinary system. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (Eds). **Diseases of Swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 966-967.
- FERREIRA, R. A.; SOUSA, A. V. O desenvolvimento do sistema imune de leitões e suas correlações com as práticas de manejo. **Boletim Agropecuário**, Lavras. v. 39, p.1-39. 2002. Available at: <[http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol\\_46.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_46.pdf)>. Accessed: February 24, 2007.
- HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAES, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.100, n. 3/4, p. 255-268, 2004.
- IRIGOYEN, L. F.; ALSTINE, W. V.; TUREK, J.; CLARK, L. K. Ultrastructural observation of the airways of recovered and susceptible pigs after inoculation with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.1-7, 1998.
- MARTÍNEZ, J.; JARO, P. J.; ADURIZ, G.; GÓMEZ, E. A.; PERIS, B.; CORPA, J. M. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 1, p. 160-164, 2007.
- MARTÍNEZ, J.; SEGALÉS, J.; ADURIZ, G.; ATXAERANDIO, R.; JARO, P.; ORTEGA, J.; PERIS, B.; CORPA, J. M. Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. **Research in veterinary science**, London, v. 81, n. 1, p. 92-98, 2006.
- MAXIE, M. The urinary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds). **Pathology of Domestic Animals**. vol.2. San Diego, Califórnia:Academic Press, 4th ed., 1993. p. 447-538.
- PIFFER, I. A.; PERDOMO, C. C.; SOBESTIANSKY, Y. Efeito de fatores ambientais na ocorrência de doenças. In: SOBESTIANSKY, Y.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S. **Suinocultura Intensiva: Produção, manejo e saúde do rebanho**. Brasília: Embrapa-CNPNSA, 1998. p. 257-274.



Porcine enzootic...

CARRIJO, K. F.; NASCIMENTO, E. R.; TORTELLY, R.

RO, L. H.; ROSS, R. F. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 44, n. 11, p. 2087-2094, 1983.

SCOFANO, A. S. **Pneumonia enzoótica suína: diagnóstico anátomo-patológico, prevalência e efeitos sobre o desenvolvimento da carcaça**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

STAKENBORG, T.; VICCA, J.; BITAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 1/2, p. 20-36, 2005.

SUTER, M.; KOBISCH, M.; NICOLET, J. Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. **Infection and immunity**, Washington, v. 49, n. 3, p. 615-620, 1985.

THANAWONGNUWECH, R.; THACKER, B.; HALBUR, P.; THACKER, E.L. Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 5, p. 901-908, 2004.

TIMENETSKY, J. **Micoplasmas**. Universidade Federal de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. 2005. Available at: <[http://www.icb.usp.br/~bmm/bmm\\_dpto/pdfs/jorge.pdf](http://www.icb.usp.br/~bmm/bmm_dpto/pdfs/jorge.pdf)>. Accessed May 26, 2006.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2004. 556 p.

VAN ALSTINE, W. G.; STEVENSON, G. W.; KANITZ, C.L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 3/4, p. 297-303, 1996.

WILKIE, B.; MALLARD, B. Selection for high immune response: an alternative approach to animal health maintenance? **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 72, n. 1/2, p. 231-235, 1999.