

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INFLUÊNCIA DA IMUNIDADE DE MATRIZES SUÍNAS NA RESPOSTA À  
VACINAÇÃO DE LEITÕES CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae*

HÉBER EDUARDO HEIN

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INFLUÊNCIA DA IMUNIDADE DE MATRIZES SUÍNAS NA RESPOSTA À  
VACINAÇÃO DE LEITÕES CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae*

Autor: Héber Eduardo Hein

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia

Orientador: PhD Luís Gustavo Corbellini

PORTO ALEGRE

2015

#### CIP - Catalogação na Publicação

Hein, Héber Eduardo

Influência da imunidade de matrizes suína na  
resposta à vacinação de leitões contra Mycoplasma  
hyopneumoniae / Héber Eduardo Hein. -- 2015.  
49 f.

Orientador: Luís Gustavo Corbellini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Imunidade humoral. 2. Imunidade celular. 3.  
Lesão pulmonar. 4. Pneumonia Enzoótica Suína. I.  
Corbellini, Luís Gustavo, orient. II. Título.

Héber Eduardo Hein

Influência da imunidade de matrizes suínas na resposta à vacinação de leitões contra  
*Mycoplasma hyopneumoniae*

Aprovada em 30 de abril de 2015

APROVADO POR:

---

Prof. PhD Luís Gustavo Corbellini  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. PhD Ana Paula Ravazzolo  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eliana Knackfuss Vaz  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Mari Lourdes Bernardi  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Veterinária por oportunizar um ensino de qualidade e disponibilizar sua estrutura para meu estudo.

Ao meu orientador, Luís Gustavo Corbellini pela força, amizade e incentivo durante a jornada iniciada ainda na graduação.

Aos demais professores do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva pelas orientações e conversas na hora do cafezinho.

Aos amigos da Preventiva e do EPILAB que me auxiliaram durante o experimento, em especial aos que fizeram força nas colheitas de campo e análises laboratoriais. Estes inicialmente sempre juntos, e agora só no "*whats*".

A toda minha família que, mesmo longe, me incentivou nos estudos. Em especial à minha esposa Renata.

Ao corpo técnico e produtores da cooperativa em que foi realizada a etapa de campo e, também, ao laboratório farmacêutico que expôs o problema de pesquisa e propiciou o auxílio financeiro para as colheitas e análises.

## RESUMO

A suinocultura está amplamente difundida no Brasil, o quarto maior produtor mundial de carne suína. Seu efetivo está concentrado em maior parte na região Sul, com 48,8% dos suínos. Porém, a intensificação e o confinamento das criações expõem os animais a agentes patogênicos, como o *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyo*), causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES). A doença é caracterizada pela ocorrência de tosse seca não produtiva e lesões pulmonares de consolidação, denominadas hepatização. A vacinação de leitões é uma importante ferramenta empregada no controle da PES. Contudo, é relatado que a imunidade passiva adquirida pelos leitões através do colostro das matrizes suínas pode interferir na sua resposta à vacinação contra o *Mhyo*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da imunidade materna na resposta à imunização de leitões contra *Mhyo* ao desmame. Dez matrizes foram divididas em dois grupos baseado na Razão S/P de um teste ELISA comercial, um com baixo nível de anticorpos (Ac) anti-*Mhyo* (BAC, Razão S/P <0,75) e outro com alto nível (AAc, Razão S/P ≥0,75). De cada fêmea, dois leitões eram controles (contr) e nove vacinados (vac) contra *Mhyo*. Estes grupos e tratamentos foram comparados entre si quanto a parâmetros de imunidade humoral, celular e comprometimento pulmonar ao abate. Após a ingestão de colostro, os leitões das fêmeas AAc mantiveram os maiores níveis de Ac, até os 56 dias de idade. Quando avaliados através do teste ELISA, dos 13 aos 99 dias depois de vacinados os leitões BAC-vac apresentaram níveis de Ac mais estáveis, com um aumento significativo aos 113 dias pós-vacinação. Os parâmetros celulares não diferiram entre grupos e tratamentos, com exceção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, com menores percentuais entre os vacinados. Independente do grupo, os vacinados tiveram menor comprometimento pulmonar, porém os BAC-vac tiveram menos lesões que os AAc-vac. Os resultados demonstraram que a vacinação dos leitões contra *Mhyo* ao desmame os protege contra o agente, levando ao menor comprometimento pulmonar, principalmente quando a imunização ocorre na presença de baixos níveis de Ac passivos.

**Palavras chave: imunidade humoral, imunidade celular, lesão pulmonar, pneumonia enzoótica suína**

## ABSTRACT

Swine production is widespread in Brazil, being the fourth largest producer of pork meat. Swines are concentrated in the Southern region, comprising 48.8% of pig population. However, due to confinement system, pigs are exposed to pathogens such as the bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), responsible for swine enzootic pneumonia (SEP). The disease is characterized by a dry, nonproductive cough, and macroscopic areas of consolidation in the lung. The piglet vaccination is an important practice to SEP control. However, it is reported that passive immunity acquired by the piglets through the colostrum of sows may affect their response to vaccination against Mhyo. The objective of this study was to evaluate the influence of maternal immunity in the pig vaccination against Mhyo after weaning. Ten sows were divided in two groups according with the ELISA's S/P Ratio, with low (LAb, S/P Ratio <0.75) or high (HAb, S/P Ratio  $\geq$ 0.75) level of antibodies (Ab). From each sow, two piglets were controls (contr) and nine vaccinated (vac) against Mhyo. Piglets' humoral and cellular immunity and pulmonary lesions were compared between the treatments and groups of sows. The Ab level after colostrum intake was higher in piglets from HAb group of sows until 56 days of age. When evaluated by ELISA, LAb-vac piglets showed a more stable Ab levels from 13 to 99 days post-vaccination, with a significant increase at 113 days post-vaccination. No differences were detected between groups and treatments according with cellular parameters, except T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes percentages, that were lower in vaccinated piglets. Regardless of the group, vaccinated pigs had lower pulmonary lesions, but the LAb-vac piglets had less damage than the HAb-vac. These results demonstrated that piglet vaccination against Mhyo at weaning protects them against the pathogen and provides lower pulmonary lesions, especially when the immunization occurs in the presence of low levels of maternal Ab.

**Key words:** humoral immunity, cellular immunity, lung lesion, swine enzootic pneumonia.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Organograma do estudo demonstrando as colheitas de sangue programadas e as divisões de grupos de matrizes BAc (baixo nível de anticorpos) e AAc (alto nível de anticorpos), bem como dos leitões vacinados (BAc-vac e AAc-vac) e controles (BAc-contr e AAc-contr) ..... 25
- Figura 2 - Resultado do modelo misto de regressão (modelo [2]) que ilustra os níveis médios estimados de anticorpos anti-*Mhyo* (LSMeans estimado) pós-vacinal dos leitões dos diferentes grupos e tratamentos ..... 32
- Figura 3 - Distribuição da área de hepatização pulmonar (AHP%) apresentada nos pulmões dos animais "controles" e "vacinados" durante avaliação no momento do abate..... 34
- Figura 4 - Distribuição da área de hepatização pulmonar (AHP%) apresentada nos pulmões dos leitões dos diferentes *grupos\*tratamentos* durante avaliação no momento do abate..... 35



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros utilizados na realização do cálculo de amostragem de leitões nos grupos de fêmeas de baixo e alto nível de anticorpos (BAc e AAc, respectivamente), levando em consideração o título de anticorpos ( <i>Razão S/P</i> ) pré-vacinal encontrado e o pós-vacinal estimado dos leitões.....	26
Tabela 2 -	Nível médio estimado de anticorpos anti- <i>Mhyo</i> (LSM $\pm$ EP) nas três primeiras colheitas, obtidos no modelo misto comparando os leitões provenientes dos grupos de fêmeas com alto (AAc) e baixo (BAc) nível de anticorpos.....	30
Tabela 3 -	Nível médio estimado de anticorpos anti- <i>Mhyo</i> (LSM $\pm$ EP) dos leitões de acordo com o grupo e tratamento no decorrer das oito colheitas pós-vacinação, conforme modelo [2] .....	31
Tabela 4 -	Percentual médio de células circulantes (%PMBC; LSMeans $\pm$ EP) antes da ingestão de colostro (colheita "0") e aos 33 dias de idade (colheita "4") de leitões provenientes dos grupos de baixo e alto nível de anticorpo materno (BAc e AAc, respectivamente).....	33
Tabela 5 -	Percentual médio estimado de células circulantes (LSMeans $\pm$ EP) na colheita "4", considerando seus níveis iniciais (colheita "0") como covariável nos diferentes <i>grupos*tratamentos</i> .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
AAc	Alto nível de anticorpos
AHP	Área de Hepatização Pulmonar
AIAO	<i>All-in, all-out</i> (todos dentro, todos fora)
BAC	Baixo nível de anticorpos
contr	Controle
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EP	Erro Padrão
FC	Teste de Fixação de Complemento
IC	Intervalo de Confiança
Kg	Quilograma
LSM	<i>Least Squares Means</i> (média dos quadrados mínimos)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
nm	Nanômetro
<i>Mhyo</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razão de chances)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PES	Pneumonia Enzoótica Suína
<i>Razão S/P</i>	Relação entre a absorbância da amostra e do controle positivo
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> (livre de patógeno específico)
UPL	Unidade produtora de leitões
vac	Vacinado
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Caracterização do agente <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Patogenia</b> .....	12
<b>2.3</b>	<b>Resposta imune do hospedeiro</b> .....	13
<b>2.4</b>	<b>Sinais clínicos e lesões</b> .....	14
<b>2.5</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	15
<b>2.6</b>	<b>Epidemiologia e profilaxia</b> .....	17
2.6.1	Prevalência.....	17
2.6.2	Transmissão e manutenção do agente.....	18
2.6.3	Controle e prevenção.....	19
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	22
<b>3.1</b>	<b>Caracterização do rebanho em estudo</b> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Projeto piloto</b> .....	23
3.2.1	Definição de parâmetros para formação dos grupos de fêmeas de alto e baixo nível de anticorpos.....	23
<b>3.3</b>	<b>Delineamento do estudo</b> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Cálculo amostral</b> .....	25
<b>3.5</b>	<b>Colheita e processamento de amostras</b> .....	26
<b>3.6</b>	<b>Teste de sorologia</b> .....	27
<b>3.7</b>	<b>Análise de dados</b> .....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	30
<b>4.1</b>	<b>Resposta humoral</b> .....	30
<b>4.2</b>	<b>Resposta celular</b> .....	32
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da área de hepatização pulmonar (AHP) e histopatologia</b> .....	33
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	42
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A carne suína ocupa a primeira posição em produção mundial, com mais de 110 milhões de toneladas produzidas no ano de 2014 (USDA, 2015). Dentre os maiores países produtores estão a China, União Europeia e Estados Unidos da América. Em 2014, o Brasil foi o quarto maior produtor e exportador, com 3,3 milhões e 556 mil toneladas, respectivamente (USDA, 2015). A região Sul do Brasil é a que concentra 48,8% dos 36.743.593 suínos do efetivo do país (IBGE, 2013). O Rio Grande do Sul, com 6.320.890 cabeças detém o segundo maior efetivo de suínos do Brasil, atrás apenas de Santa Catarina (IBGE, 2013).

A suinocultura intensiva busca a melhora constante de seus índices produtivos. Contudo, diversos fatores podem interferir no desenvolvimento dos animais alojados, desde genética, alimentação, práticas de manejo, ou ainda a ocorrência de doenças. As estruturas de criação, em que os suínos são confinados, permitem um contato íntimo entre os animais, facilitando a disseminação de diversos agentes patogênicos entre indivíduos suscetíveis e infectados.

A ocorrência de doenças respiratórias é um importante problema na população suína. Dentre as doenças respiratórias está a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyo*) e caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade. Ela acomete principalmente suínos nas fases de recria e terminação (SIBILA *et al.*, 2009), sendo característica a ocorrência de tosse seca não produtiva nesses animais. Estes sinais são decorrentes do comprometimento do parênquima pulmonar, que apresenta áreas de consolidação (MAES *et al.*, 1996), evidenciando microscopicamente um acúmulo de células mononucleares (KOBISCH e FRIIS, 1996).

Entre as medidas descritas para o controle da PES, a aplicação de vacinas elaboradas com culturas inativadas de *Mhyo* é uma prática rotineira nos rebanhos industriais. Esta prática visa principalmente um menor comprometimento pulmonar decorrente da colonização que o agente realiza no trato respiratório (MAES *et al.*, 1999; SIBILA *et al.*, 2007). Usualmente, sua aplicação é realizada em leitões, podendo ainda ser realizada nas matrizes como forma de reduzir a transmissão do agente à prole e aumentar os níveis de anticorpos disponibilizados no colostro (MAES *et al.*, 2008). Hodgins *et al.* (2004) relataram maior concentração de anticorpos entre os leitões decorrente da ingestão de colostro hiperimune. Porém, sugere-se que a presença destes

anticorpos maternos possa interferir negativamente na resposta imunológica apresentada pelos leitões após sua vacinação (BANDRICK *et al.*, 2014b; HODGINS *et al.*, 2004).

Desta forma, a partir do acompanhamento de parâmetros de imunidade humoral e celular, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da imunidade materna na resposta à imunização de leitões contra *Mhyo* ao desmame.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização do agente *Mycoplasma hyopneumoniae*

O *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyo*), pertencente à classe dos menores procariotos de vida livre (Classe *Mollicutes*, do latim *mollis*=mole, *cuttis*=pele), é uma bactéria extracelular, imóvel e desprovida de parede celular (WALKER, 1999; QUINN *et al.*, 2004). Apesar de ser classificado como gram-negativo o *Mhyo* é fracamente corado pelo método de coloração de GRAM, sendo melhor visualizado quando utilizada coloração de Giemsa ou, ainda, azul de metileno (WALKER, 1999). Pela ausência de parede celular e presença de uma membrana trilaminar composta de proteínas, glicoproteínas, glico- e fosfolipídios, acabam por apresentar uma morfologia variada, podendo demonstrar as formas esférica, espiral, filamentosa ou de pera (KOBISCH e FRIIS, 1996; QUINN *et al.*, 2004; CONCEIÇÃO e DELLAGOSTIN, 2006).

Seu crescimento em meios de cultura para fins de diagnóstico pode estender-se por um período de quatro a oito semanas (THACKER, 2006). Sua principal característica em cultivo microbiológico é a formação de microcolônias com aspecto de ovo frito, as quais apresentam um diâmetro entre 0,1 e 0,6 mm e crescimento para dentro do meio de cultura (WALKER, 1999). Este método de diagnóstico requer a adição de fatores de crescimento específicos para o desenvolvimento do patógeno, dentre os quais podem ser citados a adição de colesterol, purinas e pirimidinas, empregando-se ainda um ambiente de microaerofilia (5-10% CO<sub>2</sub>) (THACKER, 2006).

### 2.2 Patogenia

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é causada pelo *Mhyo* e pode ser exacerbada na presença de agentes secundários e variáveis ambientais adversas (MAES *et al.*, 1996). A infecção dos suínos se inicia no trato respiratório a partir da inalação de partículas de aerossóis contendo o *Mhyo*, oriundos principalmente de animais carreadores assintomáticos. Inicialmente, o agente utiliza-se de adesinas presentes em sua cápsula, como a proteína P97, para se ligar à membrana das células ciliares do trato respiratório do animal (ZHANG *et al.*, 1995). Esta aderência propicia sua colonização que, em estágios iniciais da infecção, limita-se às porções apicais das células, sendo esta

ligação dependente da concentração de cílios e do número de bactérias (ZHANG *et al.*, 1994).

Em dois dias após a inoculação, Debey e Ross (1994) já verificaram a existência de microcolônias fortemente associadas ao epitélio ciliado. Uma vez colonizado, o animal sofre com o aumento nos níveis de cálcio intracelular que danifica os cílios (WHITHEAR e BROWNING, 2004). Isto leva a um batimento ciliar diminuído e perda gradual de cílios e células (BLANCHARD *et al.*, 1992; JACQUES *et al.*, 1992; DEBEY e ROSS, 1994) com conseqüente redução da função de limpeza e retirada de muco e de possíveis organismos oportunistas (WHITHEAR e BROWNING, 2004).

Diversas espécies de micoplasmas patogênicos (como *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. hyorhinis*, *M. bovis* e *M. pulmonis*) apresentam como característica a capacidade de alterar a expressão de seus antígenos de superfície (WHITHEAR e BROWNING, 2004). Desta forma, o agente não é reconhecido, acaba evadindo-se do sistema imunológico do hospedeiro e estabelece uma infecção crônica. Contudo, no que se referem ao *Mhyo*, estes mecanismos permanecem desconhecidos (THACKER, 2006).

### **2.3 Resposta imune do hospedeiro**

Devido à característica epiteliocorial da placenta da matriz suína, os leitões são incapazes de absorver anticorpos quando se encontram *in utero*, recebendo imunidade passiva de suas mães a partir da ingestão do colostro (ROOKE e BLAND, 2002; BANDRICK *et al.*, 2014a). As imunoglobulinas colostrais são absorvidas pelo epitélio intestinal dos recém-nascidos independentemente da fonte, seja de sua própria mãe ou de outra fêmea de outra espécie (BANDRICK *et al.*, 2011; BANDRICK *et al.*, 2014a). A quantidade absorvida pelos leitões é diretamente relacionada com os níveis contidos no colostro da fêmea (HODGINS *et al.*, 2004). Diferentemente, Tuboly *et al.* (1998) e Bandrick *et al.* (2011) descreveram que as células imunes apenas são absorvidas quando provenientes do colostro da própria mãe do neonato, possivelmente pela presença de mecanismos seletivos envolvidos em sua absorção. A quantidade de colostro consumida varia para cada leitão (ROOKE e BLAND, 2002), em especial pela competição da leitegada pelos tetos da fêmea e ainda pela ordem de nascimento, acabando por influenciar na absorção de imunoglobulinas e células.

A absorção das imunoglobulinas intactas pelos leitões deve ocorrer em um curto espaço de tempo logo após seu nascimento. Em 24 horas pós-nascimento inicia-se o

"fechamento intestinal" em que os enterócitos imaturos do intestino delgado, responsáveis pela endocitose das imunoglobulinas, são substituídos por maduros, incapazes de absorver de forma intacta estas macromoléculas de proteínas (ROOKE e BLAND, 2002). Considerando este curto período e as especificidades na absorção de componentes imunes presentes no colostro, é importante garantir a ingestão de colostro pelos leitões antes da realização de qualquer manejo que busque a equalização de leitegadas. Desta forma, permite-se um adequado desenvolvimento do sistema imune do animal que minimizará sua suscetibilidade aos patógenos no decorrer de sua vida.

As respostas celular e humoral contra *Mhyo* foram identificadas após a vacinação ou infecção natural dos suínos (THACKER *et al.*, 1997; THACKER *et al.*, 1998; KRISTENSEN *et al.*, 2004; MARTELLI *et al.*, 2006; SIBILA *et al.*, 2007; KICK *et al.*, 2011). Porém, Thacker *et al.* (1997) relataram ser desconhecida a predominância de um único tipo de resposta imune contra a infecção por *Mhyo*. Independentemente da origem antigênica, a produção de anticorpos não previne que ocorra a colonização por *Mhyo* (THACKER *et al.*, 1998). Apesar disto, a vacinação dos suínos com subsequente resposta imune propicia um menor desenvolvimento de lesões pulmonares (SCHEIDT *et al.*, 1994; BACCARO *et al.*, 2006; REYNOLDS *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2011), com resultados dependentes do protocolo vacinal empregado (KIM *et al.*, 2011; HILLEN *et al.*, 2014).

#### **2.4 Sinais clínicos e lesões**

A PES apresenta alta morbidade e baixa mortalidade nos planteis em que se instala. Ela acomete suínos de qualquer faixa etária; porém, a maior susceptibilidade ocorre nos animais alojados nas fases de recria e terminação (SIBILA *et al.*, 2009), os quais apresentam um quadro clínico crônico caracterizado por tosse seca não produtiva. Sørensen *et al.* (1997) relataram o aparecimento de tosse, em média treze dias após a infecção experimental de suínos SPF com três meses de idade, cessando após decorridos cerca de dois meses da infecção. Contudo, esta apresentação depende de fatores como o estado imune ou o manejo empregado na criação dos animais desafiados (MAES *et al.*, 1996). No caso de infecções unicamente com *Mhyo*, a PES pode ocorrer de forma subclínica. Já em infecções associadas a agentes secundários, os animais inicialmente acometidos pelo *Mhyo* podem vir a apresentar sinais mais severos associados com febre,



prostração e perda de apetite (THACKER, 2006), dificuldade de respiração, podendo até ocorrer a morte do animal (SIBILA *et al.*, 2009).

Após a infecção inicial e aparecimento dos sinais clínicos ocorre o desenvolvimento das lesões pulmonares, já a partir de uma semana pós-infecção (UNDERDHAL *et al.*, 1980). Em estágios iniciais, caracteriza-se por uma pneumonia catarral nas porções ventro-craniais do pulmão (MAES *et al.*, 1996). Havendo a cronificação do caso, o pulmão apresenta áreas de consolidação com superfície deprimida em relação às porções normais do órgão e coloração variando do roxo ao cinza (denominadas de áreas de hepatização pulmonar). Neste caso, há um maior acometimento dos lobos apical direito e ambos os cardíacos, como demonstraram Sørensen *et al.* (1997) que, aos 28 dias pós-infecção, verificaram lesão nestes lobos em mais de 96% dos pulmões avaliados, com resolução quase que completa das mesmas em até 85 dias.

Microscopicamente é verificada hiperplasia das células epiteliais das vias respiratórias, com grande acúmulo de células mononucleares nas zonas perivascular e bronquiolar, com maior abundância de plasmócitos que de linfócitos (KOBISCH e FRIIS, 1996). Em estágios crônicos da infecção por *Mhyo* ocorre a hiperplasia linfóide peribronquiolar (SØRENSEN *et al.*, 1997; THACKER, 2006). Devido à aderência do *Mhyo* às células das vias respiratórias, o epitélio ciliado é danificado, havendo perda de cílios e exposição das microvilosidades desde os estágios iniciais da infecção, com a agregação local de micoplasmas que permite sua propagação por toda superfície do aparelho respiratório (UNDERDHAL *et al.*, 1980).

## 2.5 Diagnóstico

O aparecimento gradual de tosse crônica durante o alojamento de um lote de suínos, principalmente durante as fases de recria e terminação, é um importante sinal clínico que pode evidenciar a presença do *Mhyo* no rebanho (DESROSIERS, 2001; SIBILA *et al.*, 2009). A presença de outros sinais como febre, redução de apetite e prostração são geralmente decorrentes de co-infecções (THACKER, 2006; SIBILA *et al.*, 2009). A avaliação pulmonar, realizada normalmente durante o processo de abate dos lotes de suínos, busca verificar a ocorrência e severidade de lesões pneumônicas. Caso o animal apresente soroconversão em um período próximo ao abate, ele desenvolverá lesões mais extensas (ANDREASEN *et al.*, 2001), uma vez que as lesões

de consolidação pulmonar tendem a cicatrizar em média 85 dias após a infecção por *Mhyo*, como descreveram Sørensen *et al.* (1997). Na busca por um diagnóstico presuntivo, as informações inerentes aos sinais clínicos e às lesões pulmonares devem ser complementadas com os padrões celulares encontrados no exame histopatológico. Pelo fato de estas características não serem patognomônicas da infecção por *Mhyo*, é relevante o emprego de exames complementares para a confirmação do diagnóstico (THACKER, 2006; SIBILA *et al.*, 2009).

O teste "padrão ouro" para a detecção do *Mhyo* é o isolamento bacteriano, mas é pouco utilizado pela natureza fastidiosa do crescimento do agente (THACKER, 2006); embora, em infecções crônicas, apresente sensibilidade superior que a de outros métodos (SØRENSEN *et al.*, 1997). O *Mhyo* pode ser isolado de amostras de muco traqueal e de tecido pulmonar (KOBISCH e FRIIS, 1996; QUINN *et al.*, 2004). Marois *et al.* (2007) verificaram que, para o isolamento, o processamento de amostras de suabe traqueal e de lavados traqueo-bronquiais são melhores se comparados com suabes nasais ou de tonsila.

O emprego de testes sorológicos na busca por anticorpos específicos é um importante método indireto utilizado largamente no diagnóstico populacional, principalmente em monitorias sanitárias (SIBILA *et al.*, 2009). Dentre os testes, há a hemaglutinação indireta, a fixação de complemento (FC) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Bereiter *et al.* (1990) compararam diferentes métodos sorológicos e verificaram que a FC e o ELISA detectaram anticorpos em dois e três dias após a inoculação de *Mhyo*, respectivamente. Porém, neste mesmo acompanhamento, o ELISA foi capaz de detectar anticorpos mesmo em níveis baixos até um ano após a inoculação, enquanto a FC até um período de cinco meses. Atualmente, Erlandson *et al.* (2005) verificaram que em estágios iniciais da infecção, o ELISA, tanto indireto quanto o de bloqueio, mostra-se ineficiente na detecção de anticorpos; possivelmente pelo fato de que o agente ataca os cílios do trato respiratório com baixa exposição ao sistema imune (THACKER, 2004). Esta característica pode resultar em uma resposta imune demorada e variável, com início de soroconversão entre duas e quatro semanas após os animais serem infectados (MAROIS *et al.*, 2007), podendo iniciar já aos oito dias pós-infecção (SØRENSEN *et al.*, 1997).

Técnicas como a imunistoquímica e a imunofluorescência são utilizadas para a detecção do *Mhyo*, porém há a possibilidade de resultados falso-negativos (baixa sensibilidade), uma vez que apenas uma pequena amostra de pulmão é utilizada

(SIBILA *et al.*, 2009). Outra desvantagem do método é que não permite a colheita de amostra de animais vivos. Por utilizar anticorpos monoclonais, não há reação cruzada com outros micoplasmas suínos, o que reduz as chances de ocorrência de resultados falso-positivos (THACKER, 2004).

A identificação direta do agente por métodos moleculares pode ser empregada em animais vivos ou mortos, a partir de amostras de suabes nasal, traqueo-bronquial, de tonsilas ou ainda de lavados bronquiais. O diagnóstico de *Mhyo* pode ser realizado por hibridização *in situ* ou pelas técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR, *Nested-PCR*, *Real Time-PCR*) (STÄRK *et al.*, 1998; CALSAMIGLIA *et al.*, 1999; MAROIS *et al.*, 2010). As técnicas de PCR são as mais utilizadas por serem capazes de detectar o agente em pequenas quantidades, menos de  $8 \times 10^4$  células bacterianas na PCR convencional (CALSAMIGLIA *et al.*, 1999). Elas ainda permitem a detecção em estágios mais precoces da infecção que as provas sorológicas, sendo uma importante ferramenta para traçar o perfil da infecção por *Mhyo* nos rebanhos de suínos (CALSAMIGLIA *et al.*, 2000). Sørensen *et al.* (1997) relataram em seu estudo que a PCR deve ser a técnica de escolha em amostras de suabe nasal em programas de vigilância de infecções de *Mhyo*, pois apresenta resultados mais satisfatórios que o cultivo bacteriológico e o ELISA.

## 2.6 Epidemiologia e profilaxia

### 2.6.1 Prevalência

A maioria dos estudos envolvendo a ocorrência de *Mhyo* relata o acompanhamento de lotes de suínos durante o abate, limitando-se a descrever a ocorrência de lesões pulmonares sugestivas de PES. Os estudos de prevalência envolvendo a infecção por *Mhyo* são escassos, porém demonstram que o agente está presente na maioria das criações de suínos.

Grosse Beilage *et al.* (2009), em seu estudo de soroprevalência e fatores de risco à soropositividade de matrizes suínas na região noroeste da Alemanha, verificaram que 65% das 2.578 matrizes amostradas eram soropositivas para *Mhyo* e todos os 67 rebanhos apresentavam no mínimo 14% de suas matrizes soropositivas. Já na região sudeste da China foram avaliadas doze granjas, das quais dez (83%) eram positivas, com uma soroprevalência média intra-rebanho de 45,7% (HE *et al.*, 2011) e maior prevalência entre cachaços e matrizes (68,8% e 54,4%, respectivamente). Rautiainen

(1998) descreveu uma soroprevalência média de 16,3% entre as amostras de colostro de 1.773 matrizes colhidas a partir de uma amostragem randômica de 112 granjas produtoras de leitões da Finlândia.

### 2.6.2 Transmissão e manutenção do agente

A principal forma de transmissão do *Mhyo* é através do contato direto de animais suscetíveis com as secreções respiratórias de animais portadores, geralmente os mais velhos dentro de um rebanho (KOBISCH e FRIIS, 1996). Estes carreadores eliminam o agente, dispersando-o via aerossóis nas crises de tosse que apresentam (DESROSIERS, 2001; MAES, 2010; SIBILA *et al.*, 2009), sendo que os animais em contato direto com infectados podem ter até sete vezes mais chances de soroconverterem se comparados com animais que tiveram apenas contato indireto (MORRIS *et al.*, 1995). Estes aerossóis podem ser dispersos no ambiente em pequenas ou longas distâncias, como descrito por Otake *et al.* (2010), que colheram amostras de ar no entorno de uma granja infectada com *Mhyo* e detectaram o agente em uma distância de até 9,2 km do foco, sendo o mesmo viável e capaz de induzir sinais clínicos e lesões pulmonares características. Por esta razão, ao considerar a transmissão via aerossóis deve-se atentar, além da infecção intra-rebanho, também os rebanhos próximos que igualmente podem ser fonte de infecção (STÄRK, 2000). Já as formas indiretas de transmissão são menos frequentes, possivelmente por causa da baixa resistência que o agente apresenta ao ficar exposto ao ambiente fora do hospedeiro. Batista *et al.* (2004) não encontraram evidências de que a transmissão indireta por meio de pessoas tenha ocorrido, desde que seja empregado um protocolo de biossegurança antes do ingresso de pessoas aos rebanhos considerados saudáveis.

Os diferentes sistemas de criação utilizados atualmente na suinocultura tem um importante papel na forma de manutenção e disseminação do *Mhyo* nos rebanhos, uma vez que de acordo com o sistema empregado são adotadas diferentes práticas de manejo e condições de alojamento dos animais. Moorkamp *et al.* (2009) verificaram que leitões provenientes de sistemas de um (OR=3,35; IC 95%: 1,09-12,27) e dois (OR=3,65; IC 95%: 1,38-12,19) sítios de produção tinham maiores riscos de serem infectados em estágios mais precoces por *Mhyo* se comparados com criados em sistemas de três sítios. Em rebanhos de múltiplos sítios os animais são criados separadamente de acordo com a fase de produção, em que todos os alojados apresentam um nível imunológico semelhante, enquanto que em criações de ciclo completo a transmissão ocorre

inevitavelmente dos animais mais velhos, já expostos ao agente, para os mais novos. Nesse sistema de produção, Leon *et al.* (2001) sugerem ser crítico para a transmissão do *Mhyo* o período em torno dos 70 dias de idade, condizendo com o início da fase de terminação, uma vez que os animais nesta fase teriam menores concentrações de anticorpos.

### 2.6.3 Controle e prevenção

O controle das infecções por *Mhyo* pode ser baseado em diferentes práticas, buscando principalmente a prevenção e diminuição da ocorrência dos fatores de risco que possibilitem a instalação do agente no hospedeiro. Sibila *et al.* (2009) citam que um controle efetivo deve estabelecer e monitorar a situação da doença, buscando desenvolver estratégias que reduzam a transmissão do agente. Dentre as práticas empregadas no controle da PES estão envolvidas as de manejo juntamente com as instalações, bem como o uso de medicamentos ou de vacinas.

Nas práticas de manejo e instalações devem ser buscadas formas que minimizem a disseminação do *Mhyo* entre os animais. O emprego do sistema "todos dentro, todos fora" (*all-in, all-out* ou AIAO, em inglês) é uma conhecida forma que visa minimizar ou interromper o curso de infecções dentro de uma granja, visto que um lote de animais entra e sai de uma instalação ao mesmo tempo, havendo igualdade na exposição a agentes patogênicos (MAES *et al.*, 2008). A densidade de suínos utilizada igualmente influencia a disseminação do *Mhyo*, preconizando-se um mínimo de 0,7 m<sup>2</sup>/animal na fase de terminação (MAES *et al.*, 1996). Já criações com maiores densidades expõem os animais a situações de estresse e possibilitam um contato íntimo entre animais suscetíveis e infectados, além de interferir diretamente na quantidade de excrementos que geram poeira e gases que, por conseguinte, podem vir a danificar o trato respiratório. Corroborando para isto, uma ventilação adequada obtida através de um eficiente manejo das cortinas das instalações, permite uma dissipação de gases que levam à menor pressão de infecção no local de criação (STÄRK, 2000; MAES *et al.*, 1996; MAES *et al.*, 2008).

Embora não se possa eliminar o agente ou curar as lesões, a utilização de medicamentos objetiva um tratamento sintomático ao reduzir os sinais clínicos decorrentes da infecção das vias aéreas pelo *Mhyo* (MAES *et al.*, 1996). Por não apresentar parede celular, a administração de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos que atuam nesta estrutura (como penicilinas e cefalosporinas) torna-se ineficaz (WU *et al.*, 1997;

WALKER, 1999). Assim, o uso de tetraciclinas (tetraciclina, oxitetracilina) e macrolídeos (tilosina, eritromicina) é o mais indicado, pois agem diretamente na síntese proteica, impedindo a multiplicação bacteriana (KOBISCH e FRIIS, 1996; MAES *et al.*, 2008).

De forma preventiva, os antimicrobianos podem ser usados de maneira contínua, pulsada ou estratégica (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007). A forma pulsada é caracterizada pela utilização intermitente em períodos críticos para a infecção, enquanto que na contínua o medicamento é fornecido ininterruptamente aos animais. No entanto, estas formas de medicação são desaconselhadas por possibilitarem um risco aumentado de resistência bacteriana aos antimicrobianos (MAES *et al.*, 2008). Assim, a medicação estratégica é a mais recomendada e utilizada atualmente (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007), pois o antimicrobiano é empregado anteriormente aos períodos críticos em que se espera o desenvolvimento da doença, porém sem impedir que ocorra a infecção do animal (MAES *et al.*, 2008).

As vacinas se tornaram uma importante ferramenta para o controle do *Mhyo*, embora apresentem uma proteção limitada à infecção e não previnam a colonização do trato respiratório dos suínos (THACKER *et al.*, 1998). Maes *et al.* (1999) verificaram que a vacinação de suínos tem como benefícios a menor ocorrência e severidade de lesões pulmonares e ainda uma melhora na conversão alimentar e ganho de peso diário. Diversas estratégias vacinais são preconizadas para a imunização dos rebanhos, devendo para isto ser avaliado o estado imunológico dos suínos e o sistema de produção em que são criados (HAESEBROUCK *et al.*, 2004; MAES *et al.*, 2008). A mais usual é a vacinação de leitões realizada em uma ou duas doses, sendo que a dose única mostra-se mais favorável por reduzir o estresse sofrido pelo animal, que é menos manipulado, havendo ainda uma menor mão de obra envolvida no processo (BACCARO *et al.*, 2006). Com vacinação em duas doses, realizada com uma e três semanas de idade dos leitões acompanhados, Sibila *et al.* (2007) encontraram uma redução nas lesões de consolidação pulmonar próxima à 62% se comparados aos animais controle, enquanto que com dose única às seis semanas de idade houve redução de 58%.

A vacinação de matrizes é outra estratégia possível de ser empregada. Ela busca reduzir a excreção do *Mhyo* e aumentar os níveis de anticorpos que a fêmea passará aos seus leitões passivamente através do colostro (MAES *et al.*, 2008). Isto porque, uma vez que os leitões ingerem o colostro de matrizes com altos níveis de anticorpos, eles apresentam níveis igualmente altos (HODGINS *et al.*, 2004; BANDRICK *et al.*,

2014b). Sibila *et al.* (2008) descreveram que a vacinação das matrizes não influenciou a colonização de seus leitões por *Mhyo*, porém foi capaz de reduzir significativamente as lesões pulmonares compatíveis com PES no momento do abate. Entretanto, é relatado que a presença de altos títulos de anticorpos para *Mhyo* de origem materna pode influenciar negativamente a resposta dos leitões à vacinação (HODGINS *et al.*, 2004; BANDRICK *et al.*, 2014b), enquanto que baixos títulos permitem uma produção de anticorpos após a vacinação (BANDRICK *et al.*, 2014b).

### 3 METODOLOGIA

O presente estudo buscou verificar a influência da imunidade materna na resposta à imunização de leitões contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyo*) em um rebanho de suínos de uma cooperativa localizada no Vale do Taquari, no Rio Grande do Sul. A referida cooperativa aloja, em sistema de integração vertical em três sítios, aproximadamente 9.000 matrizes, distribuídas em cinco Unidades de Produção de Leitões (UPLs) próprias e em 19 de seus associados. Posteriormente, os leitões são encaminhados para uma das 60 creches e, então, para uma das 216 unidades de terminação associadas.

As etapas a campo do projeto piloto e do estudo foram realizadas no período entre agosto de 2012 e março de 2013, acompanhando os leitões desde o seu nascimento até o momento do abate.

#### 3.1 Caracterização do rebanho em estudo

As matrizes suínas acompanhadas estavam alojadas em uma UPL da cooperativa com capacidade de alojamento de 320 matrizes, com partos semanais. Estas matrizes eram provenientes da granja multiplicadora de fêmeas da própria cooperativa. Nesta unidade multiplicadora, as leitoas nascidas das matrizes "avós", as quais se tornarão as futuras matrizes comerciais, recebem no desmame uma dose de vacina anti-*Mhyo*, para, então, serem encaminhadas para uma unidade de recria de leitoas. Na recria, elas permanecem por cerca de três meses até atingirem um peso médio esperado de 90 kg, com aproximadamente 150 dias de idade, sendo neste momento destinadas às UPLs onde iniciam sua vida reprodutiva.

Na UPL, as matrizes são alojadas em baias individuais do momento da inseminação até cerca de 50 dias de gestação, para serem transferidas às baias coletivas onde permanecem até uma semana de antecedência da data prevista do parto. Após, seguem para celas parideiras localizadas nas salas de maternidade, permanecendo ali até os 21 dias de idade de sua leitegada, momento em que ocorre o desmame. O manejo da leitegada na maternidade envolve as práticas de aplicação de ferro, corte de cauda, desgaste de dentes, administração de anticoccidiano, castração e uniformização de leitegadas.



A fase de creche dos leitões, entre os 22 e 60 dias de idade, ocorreu em uma granja associada com capacidade de alojamento de 500 animais. Os leitões do estudo foram agrupados em quatro baias coletivas, com piso e paredes construídas em alvenaria.

A fase de terminação dos animais ocorreu dos 61 dias de idade até o momento do abate, aos 148 dias de idade. O alojamento nesta fase de criação ocorreu em uma granja com capacidade para 120 animais, com piso compacto e divisórias em alvenaria, com fornecimento *ad libitum* de alimentação.

### 3.2 Projeto piloto

Inicialmente foi realizado um projeto piloto com o objetivo de traçar o perfil sorológico das matrizes suínas da população alvo, a fim de possibilitar a definição de dois grupos de comparação a partir dos níveis de anticorpos (Ac) destas fêmeas. Esta primeira etapa consistiu na colheita de soro sanguíneo de 29 matrizes no período pré-parto (em média 30 dias antes da data prevista de parto), seguida de uma segunda colheita no dia do parto. Ainda no dia do parto de cada fêmea foi realizada a colheita de sangue de dois de seus leitões, com no máximo doze horas de vida. Estes leitões receberam marcação individual na orelha, propiciando uma nova colheita de sangue após três dias do nascimento, permitindo verificar a relação entre a ingestão de colostro das fêmeas e o nível de Ac adquiridos pelos leitões para utilização no cálculo amostral.

#### 3.2.1 Definição de parâmetros para formação dos grupos de fêmeas de alto e baixo nível de anticorpos

Para o estudo foi definida a separação de dois grupos de fêmeas, sendo um com baixo nível de anticorpos (BAc) e outro com alto nível de anticorpos (AAc). A distribuição da *Razão S/P* (relação entre a absorbância da amostra e do controle positivo) de anticorpos das matrizes no momento "pré-parto" (obtida pelo kit ELISA comercial, explicado posteriormente), durante a fase do projeto piloto, foi considerada para a classificação em um dos referidos grupos. Para isto foram definidos os quartis de distribuição (25%, 50% e 75%) da *Razão S/P*, considerando como grupo AAc as fêmeas que apresentaram níveis acima do terceiro quartil, ou seja, fêmeas com os 25% maiores níveis de Ac, representado por uma *Razão S/P*  $\geq 0,75$ . Já o grupo BAc foi representado por uma *Razão S/P*  $< 0,75$ .

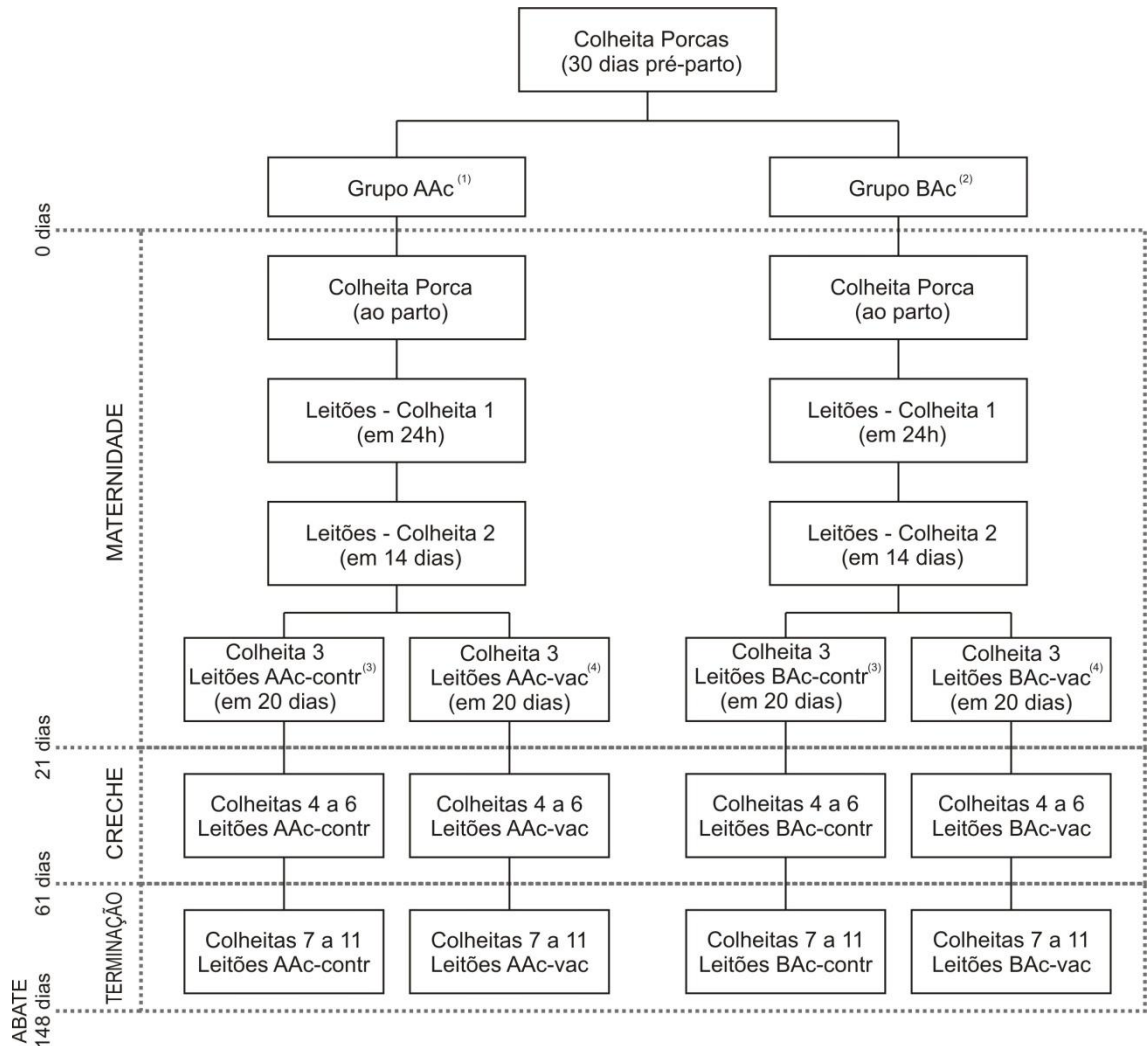
### 3.3 Delineamento do estudo

As matrizes suínas foram segregadas em dois grupos (BAc ou AAc) de acordo com a sorologia para *Mhyo* realizada no momento pré-parto (aos 30 dias pré-parto) (Figura 1). Ao parto foi realizada colheita de soro sanguíneo das matrizes, bem como a identificação de seus leitões por meio de brinco numerado na orelha, conforme o tratamento que receberiam (vacinado ou controle). Durante a fase de maternidade não foi realizada a equalização das leitegadas, permanecendo o leitão com sua mãe desde o nascimento até o desmame, evitando assim um possível viés de confundimento nas análises pela variação imune das matrizes.

Uma amostra de sangue total dos leitões foi colhida para análise por citometria de fluxo de parâmetros relacionados à imunidade celular (linfócitos B; linfócitos T CD4<sup>+</sup> – auxiliares; linfócitos T CD8<sup>+</sup> – citotóxicos; linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> – duplo-marcados; e macrófagos) no dia do nascimento (antes da ingestão do colostro, colheita "0") e aos 33 dias de idade (treze dias pós-vacinação, colheita "4").

Para a realização do teste de sorologia foram feitas colheitas seriadas de amostras de soro sanguíneo dos leitões (Figura 1), sendo a primeira no dia posterior ao nascimento, após a ingestão de colostro (colheita "1"), momento em que as matrizes também tiveram amostra colhida. A segunda e terceira colheitas foram realizadas aos 14 e 20 dias de idade. Aos 20 dias de idade, um dia antes do desmame, foi administrado no grupo de leitões vacinados de ambos os grupos 1 mL de vacina inativada contra *Mhyo* em dose única via intramuscular. Na fase de creche ocorreram igualmente três colheitas, aos 33, 46 e 56 dias de idade. Já na fase de terminação foram realizadas cinco colheitas com intervalo de 14 dias, sendo a primeira 16 dias após o alojamento nestas instalações (aos 77 dias de idade – 11 semanas), e a última 15 dias antes da data de abate (aos 133 dias de idade – 19 semanas). No total foram feitas onze colheitas de soro sanguíneo, nomeadas de "1" a "11".

Durante o processo de abate, os pulmões dos animais foram avaliados quanto à área pulmonar não funcional (área de hepatização pulmonar – AHP), conforme técnica descrita por Piffer e Brito (1991). Posteriormente, os pulmões que apresentaram lesões de consolidação compatíveis com PES tiveram uma amostra do tecido colhida para diagnóstico histopatológico.



**Figura 1** Organograma do estudo demonstrando as colheitas de sangue programadas e as divisões de grupos de matrizes em BAc (baixo nível de anticorpos) e AAc (alto nível de anticorpos), bem como dos leitões vacinados (BAc-vac e AAc-vac) e controles (BAc-contr e AAc-contr). \*Vacinação realizada aos 20 dias de idade; (1)AAc=Alto nível de anticorpos; (2)BAc=Baixo nível de anticorpos; (3)contr=controle; (4)vac=vacinado.

### 3.4 Cálculo amostral

Definido o ponto de corte para separação dos grupos de fêmeas durante a fase de projeto piloto, posteriormente foram verificados os níveis médios de Ac (*Razão S/P média*) de suas leitegadas após a ingestão de colostro, sendo este parâmetro considerado o "título pré-vacinal" para fins do cálculo amostral. Posteriormente, foi considerado um cenário pós-vacinação para os leitões provenientes dos grupos BAc e AAc de matrizes. Assim, foi estimado que os leitões oriundos do grupo BAc apresentariam uma resposta mais elevada à vacinação que os leitões do grupo AAc, com aumento respectivo de 90% e 20% nos títulos pós-vacinais.

O tamanho da amostra foi calculado no programa Stata, comando *sampsi* (*sample size and power determination*), para a comparação de médias do nível de anticorpos dos leitões dos grupos BAc e AAc, considerando os parâmetros de resposta vacinal média para os respectivos grupos (Tabela 1). O número de leitões necessário para observar uma diferença na resposta à vacinação entre os leitões dos dois grupos de fêmeas foi de 46 animais por grupo.

Para isto, a partir de 34 fêmeas coletadas no momento pré-parto, foram selecionadas cinco para comporem cada grupo, de forma que cada um dos grupos apresentasse uma distribuição homocedástica do nível de anticorpos das matrizes, verificada a partir do teste de Levene para igualdade de variâncias. Cada uma destas teve nove de seus leitões vacinados, enquanto outros dois leitões não foram vacinados, servindo como população controle dentro de cada leitegada, totalizando 55 leitões por grupo.

**Tabela 1** Parâmetros utilizados na realização do cálculo de amostragem de leitões nos grupos de fêmeas de baixo e alto nível de anticorpos (BAc e AAc, respectivamente), levando em consideração o título de anticorpos (*Razão S/P*) pré-vacinal encontrado e o pós-vacinal estimado dos leitões.

Leitões	Grupo BAc <sup>1</sup>		Grupo AAc <sup>2</sup>	
	<i>Razão S/P</i> média	DP <sup>3</sup>	<i>Razão S/P</i> média	DP <sup>3</sup>
Título pré-vacinal	0,26	0,22	0,81	0,28
Título pós-vacinal	0,49	0,1	0,97	0,1
Resposta vacinal <sup>4</sup>	0,23	0,1	0,16	0,1

<sup>1</sup>BAc=Baixo nível de anticorpos; <sup>2</sup>AAc=Alto nível de anticorpos; <sup>3</sup>DP= Desvio padrão; <sup>4</sup>(Título pós-vacinal) - (Título pré-vacinal).

### 3.5 Colheita e processamento de amostras

Após contenção manual dos leitões, as colheitas de sangue do nascimento até a saída da fase de creche foram realizadas puncionando a veia cava cranial mediante o uso de sistema de coleta a vácuo identificado individualmente com o número de cada animal. Já as matrizes da UPL e os animais na fase de terminação foram contidos em estação, utilizando-se de conjunto composto por seringa e agulha para a colheita da amostra por punção das veias cava cranial ou jugular.

Após a colheita de sangue dos animais, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente em tubo de colheita sem aditivos para a obtenção do soro sanguíneo. Posteriormente, os soros foram centrifugados e uma alíquota foi transferida

para microtubos de centrifugação para serem mantidos congelados até o momento da realização do teste sorológico para detecção de Ac anti-*Mhyo*.

Para amostras de sangue total dos leitões, foi utilizado conjunto de seringa e agulha heparinizados. Após a colheita as amostras foram vertidas em tubos de sistema à vácuo com anticoagulante e levemente homogeneizados, sendo mantidos sob refrigeração e, assim, enviadas para a análise laboratorial por citometria de fluxo pelo laboratório Imunova Análises Biológicas Ltda.

Os animais que apresentaram áreas de hepatização pulmonar (AHP) compatíveis com PES ao abate tiveram uma amostra do tecido colhida na zona de transição (entre tecido lesionado e sem lesão) e dispostos em frascos com Formalina 10% e remetidas ao Setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS).

### 3.6 Teste de sorologia

A detecção de Ac anti-*Mhyo* foi realizada no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS. A metodologia aplicada para a realização do diagnóstico do agente por meio de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) seguiu as instruções do fabricante contidas no kit (IDEXX *M. hyo.*). Em resumo, inicialmente as amostras de soro foram diluídas na proporção 1:40. Após foi realizada a distribuição de 100 µL de cada amostra diluída, bem como das duplicatas dos controles negativos e positivos não diluídos na placa de 96 poços impregnada com antígeno, sendo incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, seguida da aspiração do líquido presente nos poços da placa. Seguiu-se a etapa de lavagem dos poços com 350 µL de solução própria, repetida quatro vezes. Após a lavagem, foram distribuídos 100 µL de conjugado em cada poço, seguido de nova incubação por 30 minutos para então realizar nova etapa de lavagem por mais quatro vezes. Posteriormente, foram distribuídos 100 µL da Solução de Substrato TMB em cada poço, com incubação da placa por 15 minutos. Terminada a incubação foram adicionados 100 µL de solução de interrupção em cada um dos poços, a fim de parar a reação, seguindo-se da medição dos níveis de absorbância das amostras em espectrofotômetro de microplaca Asys Expert Plus (Asys Hitech GmbH, Austria) na absorbância de 650 nm.

Verificado o nível de absorbância das amostras, bem como dos controles positivo e negativo, foi calculada a *Razão S/P* para a determinação do nível de Ac, conforme fórmula descrita no manual do fabricante.

$$Razão S/P = \frac{\text{Amostra} - \text{Média CN}}{\text{Média CP} - \text{Média CN}}$$

Sendo,

Amostra: nível de absorbância da amostra

Média CN: média de absorbância entre os controles negativos

Média CP: média de absorbância entre os controles positivos

### 3.7 Análise de dados

Os dados referentes a cada um dos leitões, bem como de suas mães foram armazenados em planilha eletrônica do Microsoft Excel®.

Os dados de sorologia dos leitões foram analisados em dois modelos mistos, com o procedimento PROC MIXED no programa SAS (versão 9.2 para Windows, Copyright © 2012 SAS Institute Inc.). Neles o resultado da sorologia (*Razão S/P*) dos 55 leitões de cada grupo em cada coleta foi considerado como variável resposta. Cada leitão foi utilizado como unidade experimental e os dados das várias coletas foram analisados como medida repetida. Os resultados dos modelos foram demonstrados conforme estimativa da média dos quadrados mínimos (LSM, *Least Squares Means*, em inglês).

O modelo [1] utilizou o grupo de matrizes de procedência (BAc ou AAc) como variável explanatória para avaliar o efeito do nível de Ac anti-*Mhyo* das matrizes sobre os níveis apresentados pelos leitões nas três primeiras colheitas realizadas no estudo.

O modelo [2] buscou avaliar os efeitos decorrentes da interação *grupo\*tratamento\*colheita*, obtida a partir do grupo (BAc e AAc) e tratamento (vacinado ou controle) sobre os níveis de Ac anti-*Mhyo nas colheitas "4" à "11"*.

As diferenças entre grupos e tratamentos sobre os parâmetros de imunidade celular considerou as porcentagens de cada célula na colheita "0" como covariável ao avaliar seus níveis na colheita "4", posterior à vacinação.

Já para a avaliação do comprometimento pulmonar dos animais no momento do abate foram utilizados os testes não paramétricos Mann-Whitney para duas amostras independentes (quando comparados só os grupos de procedência ou tratamentos), ou o

teste Kruskal-Wallis para mais de três grupos independentes (quando considerada a interação *grupo\*tratamento*).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resposta humoral

Conforme os níveis de Ac anti-*Mhyo* demonstrados pelas matrizes nos 30 dias anteriores à data prevista do parto, houve a distribuição das mesmas nos grupos de BAc ou AAc, sendo alocadas cinco fêmeas em cada um. Na referida colheita, as matrizes selecionadas para os grupos BAc e AAc apresentaram uma *Razão S/P* média  $\pm$  DP de  $0,39 \pm 0,19$  e  $1,44 \pm 0,32$ , respectivamente. No momento do parto, houve uma diminuição na concentração individual de Ac das fêmeas que variou entre 22 e 66% no grupo de BAc, e de até 30% no grupo de AAc (*Razão S/P* média  $\pm$  DP=  $0,23 \pm 0,11$  e  $1,33 \pm 0,37$ , respectivamente). Apenas duas fêmeas do AAc apresentaram elevação nos níveis de Ac ao parto, tendo um acréscimo de 2% e 12% aos níveis pré-parto.

Após os leitões ingerirem o colostro de suas mães, foi possível verificar que os animais provenientes do grupo AAc apresentaram níveis de anticorpos (Ac) anti-*Mhyo* superiores aos do grupo BAc (*Razão S/P* média  $\pm$  EP=  $1,51 \pm 0,031$  e  $0,47 \pm 0,031$ , respectivamente;  $P < 0,0001$ ). Neste momento, verificou-se ainda uma forte correlação entre o nível de anticorpos dos leitões e o apresentado pelas matrizes ao parto ( $r=0,954$ ), sendo que 91% ( $r^2=0,91$ ) da variação dos níveis de Ac dos leitões após a ingestão de colostro de suas mães é explicada pelos níveis de Ac das fêmeas ao parto.

De acordo com o modelo [1], embora os leitões do grupo AAc tenham apresentado um decréscimo nos níveis de Ac no decorrer do experimento, eles mantiveram níveis médios maiores que do grupo BAc nas três colheitas que antecederam a vacinação (Tabela 2).

**Tabela 2** Nível médio estimado de anticorpos anti-*Mhyo* (LSM  $\pm$  EP) nas três primeiras colheitas, obtidos no modelo misto comparando os leitões provenientes dos grupos de fêmeas com alto (AAc) e baixo (BAc) nível de anticorpos.

Colheita	Idade	Grupo BAc	Grupo Aac	P
1	24h	$0,47 \pm 0,03$	$1,51 \pm 0,03$	$<0,0001$
2	14d	$0,2 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,03$	$<0,0001$
3	20d*	$0,11 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,03$	$<0,0001$

BAc=Baixo nível de anticorpos; AAc=Alto nível de anticorpos; LSM=*Least Squares Means*; EP=Erro padrão; d=dia; h=hora; \*Momento da vacinação.



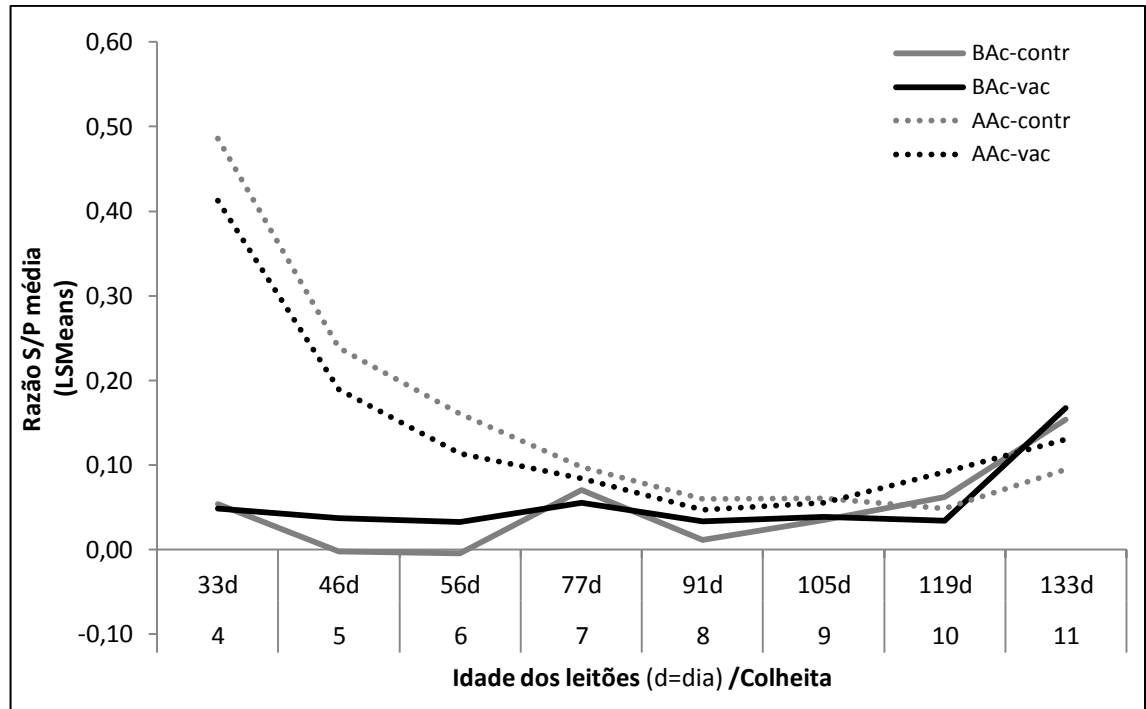
Ao avaliar a sorologia dos animais através do modelo [2], verificou-se que os leitões do grupo AAC-contr apresentaram níveis significativamente maiores que ambos os grupos BAc entre as colheitas "4" e "6" ( $P<0,0001$ ; Tabela 3). Como verificado também com os AAC-vac, que ainda apresentaram níveis significativamente superiores aos dos BAc-vac na colheita "10" ( $P=0,035$ ).

**Tabela 3** Nível médio estimado de anticorpos anti-*Mhyo* (LSM  $\pm$  EP) dos leitões de acordo com o grupo e tratamento no decorrer das oito colheitas pós-vacinação, conforme modelo [2].

Colheita	BAc-contr	BAc-vac	AAC-contr	AAC-vac
4	0,054 $\pm$ 0,044 <sup>a</sup>	0,048 $\pm$ 0,021 <sup>a</sup>	0,486 $\pm$ 0,045 <sup>b</sup>	0,413 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup>
5	-0,002 $\pm$ 0,029 <sup>a</sup>	0,037 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>	0,239 $\pm$ 0,029 <sup>b</sup>	0,189 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup>
6	-0,005 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup>	0,032 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	0,160 $\pm$ 0,024 <sup>b</sup>	0,114 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>
7	0,070 $\pm$ 0,034	0,055 $\pm$ 0,016	0,098 $\pm$ 0,038	0,084 $\pm$ 0,016
8	0,012 $\pm$ 0,031	0,034 $\pm$ 0,015	0,060 $\pm$ 0,036	0,047 $\pm$ 0,014
9	0,035 $\pm$ 0,035	0,039 $\pm$ 0,017	0,061 $\pm$ 0,040	0,055 $\pm$ 0,016
10	0,062 $\pm$ 0,041	0,034 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	0,048 $\pm$ 0,046	0,091 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup>
11	0,154 $\pm$ 0,048	0,167 $\pm$ 0,023	0,095 $\pm$ 0,055	0,130 $\pm$ 0,022

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P<0,05$ ). Modelo [2]: *sorologia* = grupo\*tratamento\*colheita; BAc=Baixo nível de AC; AAC=Alto nível de AC; vac=vacinado; contr=controle.

Quando considerado o nível de Ac de cada grupo\*tratamento em uma colheita, e compará-lo ao nível apresentado na colheita imediatamente posterior (Figura 2), foi verificado que os AAC-vac tiveram uma redução significativa de Ac da colheita "4" até a "8" ( $P<0,05$ ), e os AAC-contr até a colheita "6" ( $P<0,0001$  entre as colheitas 4-5, e  $P=0,0004$  entre as colheitas 5-6). Já os BAc-vac demonstraram um nível de Ac estável até a colheita "10", tendo um aumento significativo na colheita "11" ( $P<0,0001$ ). Entre os BAc-contr houve igualmente um aumento significativo na colheita "11" ( $P=0,039$ ).



**Figura 2** Resultado do modelo misto (modelo [2]) que ilustra os níveis médios estimados de anticorpos anti-*Mhyo* (LSMeans estimado) pós-vacinal dos leitões dos diferentes grupos e tratamentos. Modelo [2]: *sorologia* = *grupo\*tratamento\*colheita*; \*Vacinação na colheita "3" (20 dias de idade); AAc=Alto nível de anticorpos; BAc=Baixo nível de anticorpos; contr= controle; vac=vacinado; d=dia.

## 4.2 Resposta celular

Na colheita prévia à ingestão de colostro (colheita "0") os animais do grupo BAc apresentaram os maiores níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B e macrófagos quando comparado aos níveis médios dos leitões provenientes do grupo de AAc. Em ambos os grupos, a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> representou a maior proporção de células da colheita "0". Ambos os grupos demonstraram uma diminuição entre 30 e 76% nos níveis dos parâmetros celulares entre as colheitas "0" e "4", exceto no número de macrófagos que apresentou um acréscimo de 70% e 130% para os grupos BAc e AAc, respectivamente.

**Tabela 4** Percentual médio de células circulantes (%PMBC; LSMMeans  $\pm$  EP) antes da ingestão de colostro (colheita "0") e aos 33 dias de idade (colheita "4") de leitões provenientes dos grupos de baixo e alto nível de anticorpos maternos (BAc e AAc, respectivamente).

	Colheita 0		Colheita 4	
	Grupo BAc	Grupo AAc	Grupo BAc	Grupo AAc
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	23,3 $\pm$ 1,8	21,9 $\pm$ 1,9	8,9 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 0,7
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	19,9 $\pm$ 0,8	21,2 $\pm$ 0,9	13,8 $\pm$ 1,2	12,6 $\pm$ 1,3
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	11,1 $\pm$ 1,5	12,6 $\pm$ 1,6	4,2 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,3
Linfócitos B	5,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
Macrófagos	2,5 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,3

Considerando a interação *grupo\*tratamento* e o percentual inicial de células circulantes como covariável (*CEL\_0*) (Tabela 5), um maior nível de células duplo-marcadas (Linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) foi verificado nos animais BAc-contr (LSM  $\pm$  EP= 5,21  $\pm$  0,57) frente aos BAc-vac (LSM  $\pm$  EP= 3,61  $\pm$  0,33 e  $P=0,019$ ) e AAc-vac (LSM  $\pm$  EP= 3,41  $\pm$  0,35 e  $P=0,01$ ). Já os linfócitos B tiveram menor expressão nos animais AAc-contr que nos demais *grupos\*tratamentos*, havendo somente uma tendência à diferença se comparados com os BAc-vac ( $P=0,077$ ). Entre os animais vacinados, não foram verificadas diferenças entre os grupos em nenhum dos parâmetros celulares avaliados. Nenhuma das demais células avaliadas apresentou diferenças significativas aos 13 dias pós-vacinação.

**Tabela 5** Percentual médio estimado de células circulantes (LSMeans  $\pm$  EP) na colheita "4", considerando seus níveis iniciais (colheita "0") como covariável nos diferentes *grupos\*tratamentos*.

	BAc-contr	BAc-vac	AAc-contr	AAc-vac
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	8,84 $\pm$ 1,41	8,77 $\pm$ 0,8	6,77 $\pm$ 1,7	8,59 $\pm$ 0,85
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	15,96 $\pm$ 2,46	12,63 $\pm$ 1,41	14,36 $\pm$ 2,99	12,19 $\pm$ 1,49
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,21 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	3,61 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	4,28 $\pm$ 0,7	3,41 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
Linfócitos B	1,15 $\pm$ 0,25	1,44 $\pm$ 0,15	0,78 $\pm$ 0,33	1,23 $\pm$ 0,16
Macrófagos	4,4 $\pm$ 0,58	3,97 $\pm$ 0,37	5,3 $\pm$ 0,72	4,16 $\pm$ 0,38

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P<0,05$ ).

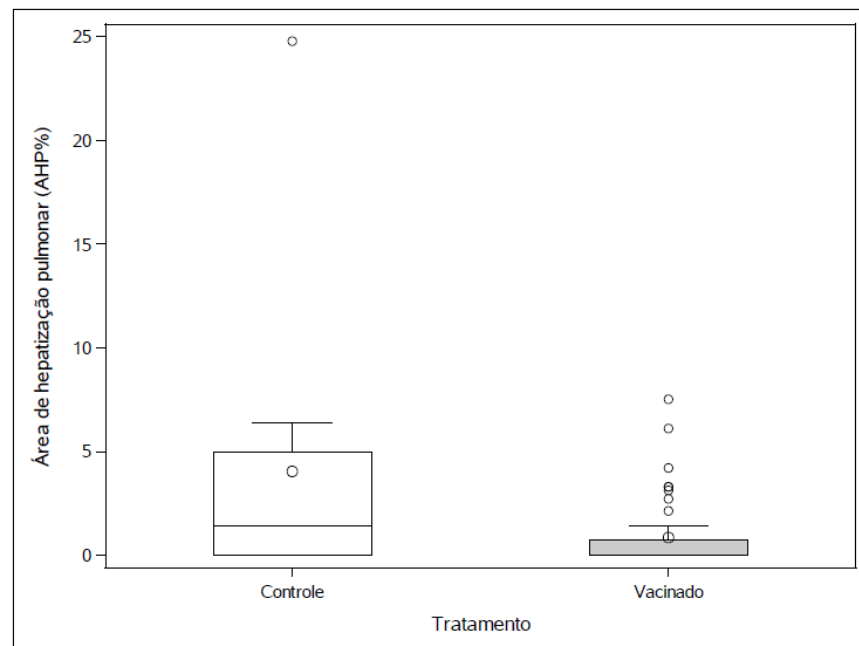
AAc=Alto nível de anticorpos; BAc=Baixo nível de anticorpos; contr= controle; vac=vacinado;

### 4.3 Avaliação da área de hepatização pulmonar (AHP) e histopatologia

Dos 110 animais identificados no início do experimento, 100 foram abatidos. Destes, 38 não tiveram seus pulmões avaliados devido a aderências à cavidade torácica ou ainda à perda de identificação nos últimos dias de alojamento na terminação. Os 62

pulmões restantes foram avaliados quanto à presença de lesões compatíveis com PES, sendo 28 e 34 dos grupos BAc e AAc, respectivamente. Um total de 30 pulmões apresentou lesões macroscópicas de consolidação compatíveis com PES, caracterizadas como áreas de hepatização pulmonar (AHP), porém em cinco destes não foi possível identificar o animal (pela perda brincos de identificação no processo de depilação ou chamuscamento das carcaças), sendo, então, 25 encaminhados para exame histopatológico.

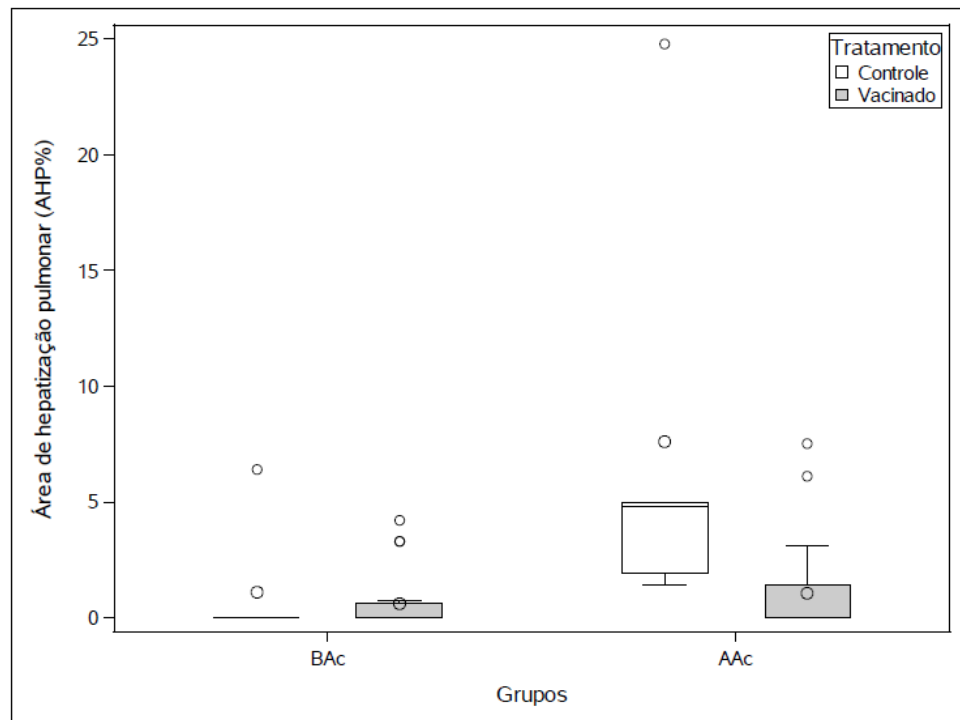
Os pulmões dos 34 animais provenientes do grupo AAc apresentaram índices de lesão significativamente maiores (média AHP%  $\pm$  EP= 1,99%  $\pm$  0,6) que os do grupo BAc (0,68%  $\pm$  0,66; teste Mann-Whitney,  $P= 0,014$ ). Quanto aos tratamentos (Figura 3), os 51 animais vacinados avaliados desenvolveram lesões menos extensas que os onze animais controle (média AHP%  $\pm$  EP = 0,83%  $\pm$  0,46 e 4,03%  $\pm$  1, respectivamente), sendo esta diferença significativa (teste Mann-Whitney,  $P= 0,04$ ).



**Figura 3** Distribuição da área de hepatização pulmonar (AHP%) apresentada nos pulmões dos animais "controles" e "vacinados" durante avaliação no momento do abate.

Considerando a interação *grupo\*tratamento* (Figura 4), cinco animais AAc-contr apresentaram AHP variando entre 1,4% e 24,8%. Contudo, na histopatologia, nenhum destes teve resultados compatíveis com *Mhyo* (2 não apresentaram alterações microscópicas, 2 com pleurite crônica e 1 com pneumonia viral). Dos outros seis

animais controle provenientes do grupo BAc, apenas um apresentou lesões pulmonares em uma área de 6,4% do órgão, sendo microscopicamente compatível com *Mhyo*. Já entre os 51 vacinados, seis e treze animais pertencentes respectivamente aos grupos BAc e AAc demonstraram hepatização pulmonar. Os primeiros tiveram um comprometimento pulmonar que variou entre 0,6% e 4,2%, e à histopatologia demonstraram resultados de *Mhyo* (2), pneumonia viral (2), pleurite crônica (1) ou inconclusivo (1). Já as lesões nos últimos variaram entre 0,6% e 7,5%, dos quais apenas três tiveram resultados histopatológicos de *Mhyo* (sendo dois associados com broncopneumonia bacteriana) e os demais apresentaram pleurite crônica (4), resultados inconclusivos (5) ou não apresentaram alterações microscópicas (1). Desta forma, o grupo de animais AAc-contr apresentou tecido pulmonar significativamente mais comprometido (média AHP%  $\pm$  EP = 7,58%  $\pm$  4,37; teste Kruskal-Wallis,  $P=0,004$ ) se comparado aos demais (BAc-contr 1,07%  $\pm$  1,07; BAc-vac 0,58%  $\pm$  0,27; AAc-vac 1,03%  $\pm$  0,34).



**Figura 4** Distribuição da área de hepatização pulmonar (AHP%) apresentada nos pulmões dos leitões dos diferentes *grupos\*tratamentos* durante avaliação no momento do abate. BAc=Baixo nível de anticorpos; AAc=Alto nível de anticorpos.

## 5 DISCUSSÃO

O estudo não foi avaliado em animais provenientes de fêmeas "controle", ou seja, não vacinadas, visto que todas as matrizes pertenciam a um plantel comercial de uma cooperativa e foram vacinadas ao menos uma vez até o início de sua vida reprodutiva. Desta forma, foi realizada a separação das matrizes em dois grupos com diferentes níveis de Ac anti-*Mhyo* como forma de avaliar a possível interferência da imunidade materna frente à vacinação dos leitões. Durante o experimento, todos os animais, independentemente do grupo e tratamento, permaneceram nas mesmas instalações, recebendo a mesma alimentação e manejo inerentes a cada fase da produção nas propriedades associadas à cooperativa. Na maternidade, cada leitão permaneceu com sua mãe, não sendo praticada a equalização de leitegadas nem a utilização de mãe de leite, buscando evitar o viés de confundimento das variações dos níveis de anticorpos de cada fêmea sobre a imunidade dos leitões. Já nas fases de creche e terminação, os animais foram criados em granjas com animais não participantes do estudo, alojados em baias coletivas, buscando assim apresentá-los aos mesmos desafios de campo.

As imunoglobulinas maternas tem um importante papel na proteção do recém-nascido e conseqüente desenvolvimento de seu sistema imune. De acordo com a característica da estrutura placentária, pode ou não ocorrer a transferência de imunoglobulinas da mãe para os fetos durante a vida intrauterina. A placenta das fêmeas suínas é classificada como epiteliocorial, a qual não permite a passagem das moléculas de imunoglobulinas da fêmea para o leitão. Assim, o colostro torna-se a única fonte de imunoglobulinas disponível para o leitão recém-nascido (SALMON *et al.*, 2009).

Comparativamente, os níveis sorológicos das matrizes tiveram uma redução entre as colheitas pré-parto e ao parto, variando entre 22-66% entre as fêmeas do grupo BAc e de até 30% nas do AAc, corroborando com os resultados de Wallgren *et al.* (1998), que demonstraram uma quantidade 51% menor de Ac no soro ao parto que a verificada quatro semanas pré-parto. Os mesmos autores ainda relatam que as quantidades de Ac anti-*Mhyo* presentes no colostro eram semelhantes às do soro quatro semanas pré-parto. Estudos anteriores demonstram que ao parto há um nível cerca de 54% maior de Ac anti-*Mhyo* no colostro das matrizes que no soro sanguíneo (MORRIS *et al.*, 1994), com cerca de 2,5 e cinco vezes mais IgG e IgA, respectivamente (BANDRICK *et al.*, 2014a).

Os resultados sorológicos demonstram a forte correlação existente entre os níveis de Ac anti-*Mhyo* apresentados pelos leitões após a ingestão do colostro (colheita "1") com o nível apresentado pelas matrizes suínas no momento do parto ( $r=0,954$ ), sendo que os leitões provenientes das fêmeas AAc tiveram nível médio de Ac aproximadamente três vezes maior que os das fêmeas BAc. Bandrick *et al.* (2014b) relataram, em mensuração prévia à ingestão de colostro, que os leitões não demonstraram imunidade humoral específica à *Mhyo*, independentemente se suas mães haviam ou não sido vacinadas contra o agente, enquanto que após a ingestão do colostro, os leitões das fêmeas vacinadas apresentaram *Razão S/P* superior aos de fêmeas "controle", confirmando a ausência de passagem de anticorpos via placenta suína.

No decorrer do estudo os leitões demonstraram diferentes padrões sorológicos, dependentes diretamente dos Ac adquiridos passivamente pelo colostro, como evidenciado na colheita "1". Esta variação ao longo do tempo deve considerar inicialmente a meia-vida média de 15,8 dias dos Ac maternos (MORRIS *et al.*, 1994). Porém, a meia-vida é dependente dos níveis iniciais de Ac que o leitão adquiriu. Como verificaram Morris *et al.* (1994) em animais com *Razão S/P* baixa ( $<0,30$ ; 14,1 dias), média ( $0,31-0,65$ ; 15,1 dias) ou alta ( $>0,65$ ; 17,7 dias). Desta forma, o alto nível inicial de Ac dos leitões do grupo de AAc permitiu que seus níveis fossem significativamente superiores aos do grupo de BAc.

Depois de realizada a vacinação aos 20 dias de idade (posterior à colheita "3"), em nenhum dos grupos de leitões foi evidenciada uma elevação considerável nos níveis de Ac sugestiva de resposta à vacinação. Hodgins *et al.* (2004) também relataram situação similar ao vacinar grupos de leitões em diferentes idades (às duas, três e quatro semanas), bem como Bandrick *et al.* (2014b), ao vacinar leitões aos sete dias de idade e avaliar a resposta vacinal aos sete e quatorze dias após a vacinação em animais provenientes de matrizes vacinadas. A ausência de uma resposta à vacinação pelos leitões pode ser explicada pela interferência dos Ac adquiridos passivamente a partir de suas mães. Isto porque, em acompanhamentos a leitegadas de fêmeas sem vacinação, é descrito que leitões vacinados apresentaram níveis de Ac significativamente maiores que os controles em 30 dias (KICK *et al.*, 2011) e três semanas pós-vacinação (HODGINS *et al.*, 2004). Desta forma, caso fêmeas controle tivessem sido acompanhadas no estudo, talvez houvesse a possibilidade de evidenciar padrões sorológicos diferentes dos aqui encontrados após a vacinação dos leitões. Porém,

mesmo não havendo uma resposta detectável a primo vacinação, o animal imunizado pode montar uma resposta secundária no momento de uma nova exposição ao agente.

Quanto às estimativas resultantes do modelo [2], em um mesmo grupo de fêmeas, não foram encontradas diferenças entre os animais controles e vacinados. Ao considerar apenas os animais vacinados, os leitões do grupo AAc-vac, mesmo apresentando uma redução nos Ac até a colheita "8", tiveram níveis significativamente superiores que os BAc-vac nas colheitas "4" à "6".

Os níveis de Ac mais estáveis apresentados pelos BAc-vac no decorrer do experimento, com uma elevação repentina e estatisticamente significativa apenas na última colheita, sugerem que a vacinação destes teve uma melhor eficiência, mantendo-os protegidos por um maior período, durante as fases de creche e terminação. Esta melhor eficiência vacinal poderia ser explicada pela baixa imunidade passiva adquirida de suas mães, resultando em uma menor interferência na produção ativa de Ac decorrente do processo de vacinação. Diferente dos AAc-vac que apresentaram uma redução constante em seus níveis de Ac, decorrente do catabolismo dos Ac de origem materna, com posterior aumento não significativo a partir da colheita "9".

Embora não tenha sido realizado nenhum teste diagnóstico objetivando a detecção do *Mhyo*, o aumento nos níveis de Ac a partir da colheita "9" observado nos leitões AAc-vac é sugestivo da exposição ao *Mhyo*. Essa exposição que pode ter ocorrido provavelmente durante o período da colheita anterior (aos 91 dias), considerando que o período de 14 dias entre as colheitas condiz com o tempo de soroconversão, que pode variar de oito a 28 dias (SØRENSEN *et al.*, 1997; MAROIS *et al.*, 2007).

Contudo, como os animais foram alojados em granjas comerciais e não houve nenhuma interferência sobre as condições de manejo e criação utilizadas, a infecção não foi algo controlado neste estudo. Desta forma não se pode precisar qual foi a dose infectante e quando houve a exposição dos animais ao *Mhyo*, que ainda pode ter ocorrido de forma desuniforme entre os animais. Considerando uma provável proteção mais duradoura e eficiente entre os animais BAc-vac, eles apresentaram tardiamente suscetibilidade ao *Mhyo*, demonstrada pelo aumento igualmente tardio (apenas na colheita "11") nos níveis de Ac. Este aumento pode ter sido influenciado por um possível aumento na pressão de infecção na fase de terminação, que poderia ser evidenciado frente ao aumento nos níveis de Ac apresentados pelos animais AAc-vac e BAc-contr entre as colheitas "9" e "11".



Os estudos de imunidade dos suínos frente ao *Mhyo* detêm-se principalmente à avaliação de parâmetros humorais, de resultados sorológicos dos animais em acompanhamentos referentes à infecção natural, experimental ou em comparativos de estratégias vacinais. Porém, a imunidade mediada por células apresenta igualmente um importante papel na defesa do animal à infecção, uma vez que a base para a produção de anticorpos passa pelo reconhecimento de antígenos pelas células de defesa (macrófagos, linfócitos B e células dendríticas). Estas células processarão as moléculas do agente invasor e apresentarão aos linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ) que, ao reconhecerem o antígeno, estimulam a resposta imune com a consequente ação dos linfócitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ) e B.

A subpopulação  $CD4^+$  de linfócitos foi a que apresentou maior proporção circulante anteriormente à ingestão de colostro em ambos os grupos de leitões. Este resultado está de acordo com o relatado por Bandrick *et al.* (2014a), que ainda descreveram maior proporção de  $CD4^+$  em colheita realizada 24 horas após a ingestão do colostro, porém, mantendo níveis constantes entre estas duas colheitas.

Os maiores percentuais de macrófagos,  $CD8^+$  e  $CD4^+CD8^+$  foram encontrados entre os animais BAc-contr e AAc-contr. Apenas as células duplo-marcadas tiveram diferença significativa constatada entre os animais BAc-contr e ambos os grupos vacinados (BAc-vac e AAc-vac). Kick *et al.* (2011) também encontraram maiores percentuais de células citotóxicas e duplo-marcadas em animais controle, porém sem diferença estatística nas células  $CD4^+CD8^+$ , observada apenas nos linfócitos T  $CD8^+$  nos três e sete dias posteriores à vacinação. A menor proporção de células duplo-marcadas dos animais vacinados pode estar relacionada à migração destas células até os tecidos linfoides, onde estimulariam uma defesa local.

Zuckermann e Husmann (1996) e Kick *et al.* (2011) descrevem um aumento nas proporções de células  $CD4^+CD8^+$  com o aumento gradual da idade dos animais. Isto evidencia sua função de célula de memória do sistema imune, sendo que um desafio exagerado ao antígeno leva a um aumento na proporção circulante desta célula (ZUCKERMANN, 1999). Contrariamente, nossos resultados demonstraram uma queda entre as duas colheitas realizadas.

Marchioro *et al.* (2013), ao vacinarem leitões aos sete dias de idade, também avaliaram diferentes subpopulações de linfócitos T, aos 23 e 51 dias pós-vacinação, não encontrando diferenças significativas entre os tratamentos aplicados. Contudo, seus

resultados foram distintos dos já apresentados, com maiores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente, nos animais controles e vacinados.

Compartilhando as funções de apresentar antígenos aos linfócitos T e de produção de Ac, os linfócitos B apresentaram comportamento semelhante aos demais parâmetros celulares, tendo uma menor expressão entre os animais controles dos grupos, porém sem diferenças relatadas entre os tratamentos. Houve apenas uma tendência à superioridade dos BAc-vac frente aos AAC-contr. Estas diferenças podem estar diretamente relacionadas com os níveis de células CD4<sup>+</sup> apresentadas por estes grupos, uma vez que ao apresentar uma menor porcentagem destas, o grupo AAC-contr teve uma menor ativação de células B. E, embora não significativo, os animais BAc-vac tiveram uma maior porcentagem de linfócitos B que os AAC-vac.

Estas diferenças nos parâmetros de imunidade celular relatadas em estudos anteriores em colheitas mais próximas à data de vacinação não puderam ser evidenciadas em nosso estudo pelo fato de que só houve duas colheitas, uma previamente à ingestão de colostro e outra apenas treze dias após a vacinação dos animais. Caso tivessem sido realizadas colheitas num menor intervalo, poderia haver a possibilidade de se encontrar resultados semelhantes aos já citados, como por exemplo, o aumento ou diminuição das células circulantes com o aumento da idade dos animais. Cabe ressaltar ainda que o cálculo amostral deste estudo estava baseado na avaliação sorológica dos animais frente ao *Mhyo*. Portanto, os resultados aqui demonstrados podem não ter evidenciado diferenças pelo baixo poder amostral (erro tipo 2), necessitando um cálculo amostral específico para a avaliação dos parâmetros de imunidade celular em estudos posteriores.

A avaliação da área pulmonar afetada por lesões pneumônicas durante os acompanhamentos de abate de lotes de suínos é uma importante ferramenta de monitoramento para a ocorrência de doenças do sistema respiratório, principalmente no caso de quadros subclínicos. Contudo, esta prática pode mostrar-se ineficaz quando se trata de PES, pois caso a infecção por *Mhyo* ocorra em períodos iniciais de criação, como por exemplo, na fase de creche, a maior parte dos animais não apresentará as lesões características de consolidação pulmonar no momento do abate, visto que as lesões tendem à resolução quase que completa em 85 dias pós-infecção (SØRENSEN *et al.*, 1997). Esse fato limita esta avaliação na identificação de lesões crônicas exclusivas das fases finais de produção dos suínos (SIBILA *et al.*, 2009). Como as lesões encontradas ao abate não são patognomônicas de PES, esta avaliação visual dos

pulmões torna-se subjetiva, motivo pelo qual é preconizado o emprego de provas complementares para a confirmação das suspeitas (SIBILA *et al.*, 2009).

Neste acompanhamento foram verificadas áreas de hepatização pulmonar (AHP) em 30% (30/100) dos animais abatidos, dos quais 25 tiveram amostras remetidas para diagnóstico histopatológico das lesões. A utilização da vacinação contra *Mhyo* em uma dose aos 21 dias de idade mostrou-se eficaz, uma vez que os animais tratados apresentaram um menor comprometimento dos lobos pulmonares se comparados aos animais controles, sustentando resultados anteriores de que a imunização reduz significativamente a severidade das lesões pulmonares (BACCARO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011; REYNOLDS *et al.*, 2009; SIBILA *et al.*, 2007), conferindo uma adequada proteção contra o agente. Já a ocorrência de lesões mais extensas entre os animais provenientes de matrizes hiperimunes (grupo AAc) não é clara, sendo maiores entre os animais controles (AHP%  $\pm$  EP = 7,58%  $\pm$  4,37) que os vacinados deste grupo (1,03%  $\pm$  0,34). Porém, mesmo os AAc-vac tiveram um comprometimento semelhante aos BAc-contr (1,07%  $\pm$  1,07) e maior que os BAc-vac (0,58%  $\pm$  0,27). Estes resultados podem ser comparados aos de Reynolds *et al.* (2009) que acompanharam animais provenientes de fêmeas soronegativas e soropositivas, havendo menor comprometimento nos animais vacinados de fêmeas soronegativas, enquanto que os animais controles desenvolveram lesões semelhantes independentemente do *status* imunológico da matriz.

## 6 CONCLUSÕES

As matrizes suínas conferem imunidade humoral contra o *Mycoplasma hyopneumoniae* para os leitões a partir da ingestão do colostro. Estes níveis de anticorpos adquiridos são fortemente correlacionados com níveis que a matriz apresenta ao parto.

Leitões vacinados provenientes de matrizes com baixa imunidade (BAc-vac) tiveram níveis de Ac mais estáveis durante toda a fase de criação,

Leitões vacinados provenientes de matrizes com baixa imunidade (BAc-vac) tiveram aumento significativo de AC entre a penúltima (99 dias pós vacinação) e última colheita (113 dias pós vacinação);

Animais vacinados apresentaram proporções significativamente menores de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplo-marcados) quando comparados aos animais BAc-contr.

Animais vacinados, independentemente do nível de Ac maternos, apresentaram menores áreas de hepatização pulmonar quando comparados aos animais controles (não vacinados).

Animais do grupo BAc-vac tiveram um menor comprometimento pulmonar que os AAc-vac, indicando que sua vacinação foi mais eficaz ao protegê-los contra o *Mhyo*, com uma menor interferência da imunidade materna.

Vacinação dos leitões contra *Mhyo* ao desmame os protege contra o agente, levando ao menor comprometimento pulmonar, principalmente quando a imunização ocorre na presença de baixos níveis de Ac passivos.

## REFERÊNCIAS

ANDREASEN, M.; MOUSING, J.; THOMSEN, L.K. No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, p.147-161, 2001.

BACCARO, M.R.; FHIROSE, F.; UMEHARA, O.; GONÇALVES, L.C.B.; DOTO, D.S.; PAIXÃO, P.; SHINYA, L.T.; MORENO, A.M. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. **The Veterinary Journal**, v.172, p.526-531, 2006.

BANDRICK, M.; PIETERS, M.; PIJOAN, C.; BAIDOO, S. K.; MOLITOR, T. W. Effect of cross-fostering on transfer of maternal immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* to piglets. **Veterinary Record**, v.168, n.4, p.100, 2011.

BANDRICK, M.; ARIZA-NIETO, C.; BAIDOO, S.K.; MOLITOR, T.W. Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. **Developmental and Comparative Immunology**. v.43, p.114-120. 2014a.

BANDRICK, M.; THEIS, K.; MOLITOR, T.W. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.124, 2014b.

BATISTA, L.; PIJOAN, C.; RUIZ, A.; UTRETA, V.; DEE, S. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, n.2, p.75-77, 2004.

BEREITER, M.; YOUNG, T.F.; JOO, H.S.; ROSS, R.F. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. **Veterinary Microbiology**, v.25, p.177-192, 1990.

BLANCHARD, B.; VENA, M.M.; CAVALIER, A.; LE LANNIC, J.; GOURANTON, J.; KOBISCH, M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.30, n.4, p.329-41, 1992.

CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; BOSCH, G.J. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. **Swine Health and Production**, v.7, n.6, p.263-268, 1999.

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.

CONCEIÇÃO, F.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.1034-1042, 2006.

DEBEY, M.C.; ROSS, R.F. Ciliostasis and Loss of Cilia Induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in Porcine Tracheal Organ Cultures. **Infection and Immunity**, v.62, n.12, p. 5312-5318, 1994.

DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Journal of Swine Health and Production**, v.9, n.5, p.233-237, 2001.

ERLANDSON, K.R.; EVANS, R.B.; THACKER, B.J.; WEGNER, M.W.; THACKER, E.L. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.13, n.4, p.198-203, 2005.

GROSSE BEILAGE, E.; ROHDE, N.; KRIETER, J. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p.255-263, 2009.

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.

HE, Y.; XU, M. J.; ZHOU, D. H.; ZOU, F. C.; LIN, R. Q.; YIN, C. C.; HE, X. H.; LIANG, R.; LIANG, M.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical southern China. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.695-698, 2011.

HILLEN, S.; VON BERG, S.; KÖHLER, K.; REINACHERB, M.; WILLEMSA, H.; REINERA, G. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, p.580–588, 2014.

HODGINS, D.C.; SHEWEN, P.E.; DEWEY, C.E. Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, n.1, p.10-16, 2004.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Produção da Pecuária Municipal 2013**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2013/ppm2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2015.

JACQUES, M.; BLANCHARD, B.; FOIRY, B.; GIRARD, C.; KOBISCH, M. In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.23, n.3, p.239-247, 1992.

KICK, A.R.; TOMPKINS, M.B.; HAMMER, M.; ROUTH, P.A.; ALMOND, G.W. Evaluation of peripheral lymphocytes after weaning and vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.68–72, 2011.

KIM, H.K.; MOON, H.J.; KIM, E.M.; YANG, J.S.; PARK, S.J.; LUO, Y.; LEE, C.S.; SONG, D.S.; KANG, B.K.; LEE, J.; PARK, B.K. A comparison of single dose efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin in swine farms with different serological patterns of PRRSV and PCV2. **Korean Journal of Veterinary Research**, v.48, n.3, p-267-274, 2008.

KIM, D.; KIM, C.H.; HAN, K.; SEO, H.W.; OH, Y.; PARK, C.; KANG, I.; CHAE, C. Comparative efficacy of commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus 2 (PCV2) vaccines in pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* and PCV2. **Vaccine**, v.29, p.3206-3212, 2011.

KOBISCH, M.; FRIIS, N.F. Swine mycoplasmoses. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.15, n.4, p.1569-1605, 1996.

KRISTENSEN, C.S.; ANDREASEN, M.; ERSBØLL, A.K.; NIELSEN, J.P. Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, p.66-70, 2004.

LEON, E.A.; MADEC, F.; TAYLOR, N.M.; KOBISCH, M. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.331-341, 2001.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Veterinary Quarterly**, v.18, n.3, p.104-109, 1996.

MAES, D.; DELUYKER, H.; VERDONCK, M.; CASTRYCK, F.; MIRY, C.; VRIJENS, B.; VERBEKE, W.; VIAENE, J.; DE 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. In: International Pig Veterinary Society Congress, 21., 2010, Vancouver. **Anais**. p.30-65, 2010.

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

MARCHIORO, S.B.; MAES, D.; FLAHO, B.; PASMANS, F.; SACRISTÁN, R.D.P.; VRANCKX, K.; MELKEBEEK, V.; COX, E.; WUYTS, N.; HAESBROUCK, F. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. **Vaccine**, v.31, p.1305-1311, 2013.

MAROIS, C.; DORY, D.; FABLET, C.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.5, p.1523-1533, 2010.

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**, v.120, p.96-104, 2007.

MARTELLI, P.; TERRENI, M.; GUAZZETTI, S.; CAVIRANI, S. Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.53, p.229-233, 2006.

MOORKAMP, L.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; GROSSE BEILAGE, E. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Coughing Piglets (3–6 weeks of age) from 50 Herds with a History of Endemic Respiratory Disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.56, p.54-56, 2009.

MORRIS, C.R.; GARDNER, I.A.; HIETALA, S.K.; CARPENTER, T.E.; ANDERSON, R.J.; PARKER, K.M. Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v.21, p.29-41, 1994.

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, n.4, p.323-337, 1995.

OTAKE, S.; DEE, S.; CORZO, C.; OLIVEIRA S.; DEEN, J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. **Veterinary Microbiology**, v.145, p.198-208, 2010.

PIFFER, I.A.; BRITO, J.R.F. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação dos rebanhos. **Série Documentos**, Concórdia:Embrapa Suínos e Aves, n.23, 1991. 12 p.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. The Mycoplasmas (Class: Mollicutes). In: \_\_\_\_\_. **Clinical Veterinary Microbiology**. Philadelphia: Elsevier, 2004. cap.35, p.320-326.

RAUTIAINEN, E. The prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds in western Finland based on the demonstration of antibodies in colostrum by ELISA. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, n.3, p.325-30, 1998.

REYNOLDS, S.C.; ST AUBIN, L.B.; SABBADINI, L.G.; KULA, J.; VOGELAAR, J.; RUNNELS, P.; PETERS, A.R. Reduced lung lesions in pigs challenged 25 weeks after the administration of a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine at approximately 1 week of age. **The Veterinary Journal**, v.181, p.312-320, 2009.

ROOKE, J.A; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, v.78, p.13-23, 2002.



SALMON, H.; BERRI, M.; GERDTS, V.; MEURENS, F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p384–393, 2009.

SCHEIDT, A.B.; MAYROSE, B.; VAN ALSTINE, W.G.; CLARK, L.K.; CLINE, T.R.; EINSTEIN, M.E. The effects of vaccinating pigs for mycoplasmal pneumonia in a swine herd affected by enzootic pneumonia. **Swine Health and Production**, v.2, n.1, p.7-11, 1994.

SIBILA, M.; NOFRARIÁS, M.; LÓPEZ-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, n.1-2, p.97-107, 2007.

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.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, p.221-231, 2009.

SOBESTIANSKY, J.; RISTOW, L.E.; MATOS, M.P.C.; BARCELLOS, D. Micoplasmoses. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia:Cânone Editorial, 2007. p.159-176.

SØRENSEN, 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.C. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine - A Literature Review. **The Veterinary Journal**, v.159, p.37–56, 2000.

STÄRK , K.D.C.; NICOLET, J.; FREY, J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air sampling with a Nested PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p.543-548, 1998.

THACKER, E.L.; BOETTCHER, T.B.; THACKER, B.J. Lymphocyte populations and antibody production in vaccinated and non-vaccinated pigs challenged with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Swine Research Report**, n.62, 1997.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; BOETTCHER, T.B.; JAYAPPA, H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Swine Health and Production**, v.6, n.3, p.107-112, 1998.

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

THACKER, E.L. Mycoplasmal Disease. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9. ed. Iowa:Blackwell Publishing, 2006. cap. 42, p. 701-717.

TUBOLY, S.; BERNÁTH, S.; GLÁVITS, R.; MEDVECZKY, I. Intestinal Absorption of Colostral Lymphoid Cells in Newborn Piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.20, p.75-85, 1988.

UNDERDAHL, N.R.; KENNEDY, G.A.; RAMOS JR., A.S. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.21, n.9, p.258-261, 1980.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Washington, Abr. 2015. 16 p. Disponível em: <[http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2015.

WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. (Ed.) **Veterinary Microbiology**. Massachusetts:Blackwell Science, 1999. p.165-172.

WALLGREN, P.; BÖLSKE, G.; GUSTAFSSON, S.; MATTSSON, S.; FOSSUM, C. Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.193-205, 1998.

WHITHEAR, K. L.; BROWNING, G. F. *Mycoplasma*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3. ed. Iowa:Blackwell Publishing, 2004. cap.29, p.397-414.

WU, C.C.; SHRYOCK, T.R.; LIN, T.L.; VEENHUIZEN, M.F. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae* in vitro. **Swine Health and Production**, v.5, n.6, p.227-230, 1997.

ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Microtiter Plate Adherence Assay and Receptor Analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.62, n.5, p. 1616-1622,1994.

ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Identification and Characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* Adhesin. **Infection and Immunity**, v.63, n.3, p. 1013-1019, 1995.

ZUCKERMANN, F.A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, p.55-66, 1999.

ZUCKERMANN, F.A.; HUSMANN, R.J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. **Immunology**, v.87, p.500-512, 1996.