

## IMPACTO DE AGENTES BACTERIANOS DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DE SUÍNOS (CDRS) NOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS E NO PESO AO ABATE EM SUÍNOS EM FASE DE TERMINAÇÃO

### *IMPACT OF BACTERIAL AGENTS FROM THE PORCINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (PRDC) ON PRODUCTIVE INDEXES AND SLAUGHTER WEIGHT PIGS*

Talita Brombilla<sup>1</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0001-6659-7338>

Renato Akio Ogata<sup>1</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0003-1394-0555>

Alessandra Figueiredo de Castro Nassar<sup>1</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0002-9176-0974>

Maristela Vasconcellos Cardoso<sup>1</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0002-9147-170X>

Vera Letticie de Azevedo Ruiz<sup>2</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0002-6983-8923>

Claudia Del Fava<sup>1\*</sup> ORCID <http://orcid.org/0000-0003-2967-0203>

<sup>1</sup>Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, Pirassununga, SP, Brasil.

\*Autora para correspondência - [delfava@biologico.sp.gov.br](mailto:delfava@biologico.sp.gov.br)

#### Resumo

O Complexo de Doenças Respiratórias em suínos (CDRS) compreende a interação de dois ou mais agentes infecciosos, manejo e ambiente. Os principais agentes bacterianos causadores de CDRS foram investigados em 115 suínos em fase de terminação em uma granja no Estado de São Paulo, Brasil: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (sorologia por ELISA, cultivo bacteriano e PCR multiplex), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) (nested PCR), *Pasteurella multocida* (PCR multiplex), *Haemophilus parasuis* (PCR multiplex), e *Streptococcus* sp (cultivo bacteriano). Foram avaliadas lesões pulmonares macroscópicas e microscópicas, e impacto nos índices zootécnicos e no aproveitamento de carcaça. Houve positividade ao Mhyo em 113 animais (98,26%), destes houve infecção associada ao *Streptococcus* sp ao Mhyo em 14,78% (17) animais. O pulmão enfisematoso diminuiu significativamente o peso no final da terminação e o peso da carcaça. Apesar de vacinados com imunógeno inativado contra Mhyo, quase 100% dos animais estavam infectados e as lesões mais observadas foram broncopneumonia purulenta e pleurite. A infecção de Mhyo associado ou não ao *Streptococcus* sp causou lesões pulmonares em diferentes graus, menor peso ao abate e da carcaça.

**Palavras-chave:** suínos, pleuropneumonia, diagnóstico diferencial, *Streptococcus* sp, *Mycoplasma hyopneumoniae*.

#### Abstract

Porcine respiratory disease complex comprises the interaction of two or more infectious agents. The major bacterial agents involved were investigated in 115 finishing pigs at a farm in São Paulo State, Brazil: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serology, bacterial culture, and multiplex PCR), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) (nested PCR), *Pasteurella multocida* (multiplex PCR), *Haemophilus parasuis* (PCR multiplex), and *Streptococcus* sp. (bacterial culture). Macroscopic and microscopic lung lesions were evaluated, and zootechnical indices were recorded. Mhyo occurred in 113 animals (98.3%), seventeen of which were co-infected with *Streptococcus* sp. The finding of emphysematous lung was associated with significantly lower final and carcass weight at slaughter. Although vaccinated against Mhyo with an inactivated immunogen, almost 100% of the animals were infected. Mhyo infection with and without *Streptococcus* sp. co-infection was related to lung lesions of varying degrees and lower slaughter and carcass weight.

**Keywords:** differential diagnosis, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pleuropneumonia, *Streptococcus* sp., swine.

Recebido em: 21 de fevereiro de 2018

Aceito em 07 de maio de 2019.

## Introdução

As doenças respiratórias constituem um dos problemas mais importantes na suinocultura tecnificada<sup>(1)</sup>. As pneumonias causam baixos índices zootécnicos, gastos com medicamentos e condenações de carcaças no abatedouro, onde aproximadamente 50% dos animais apresentam algum tipo de lesão pulmonar, sendo que estas lesões respondem por 50% de todas as condenações de carcaças<sup>(2)</sup>. Quanto mais intensiva a criação, maiores os custos de produção<sup>(3)</sup> e as populações confinadas são submetidas a manejo e ambiente que podem causar estresse e redução da imunidade, contribuindo para o aparecimento de enfermidades respiratórias<sup>(4)</sup>.

A etiologia dos problemas respiratórios em suínos é complexa, normalmente ocorrendo interação de dois ou mais agentes infecciosos<sup>(5)</sup>, podendo ser agentes bacterianos e ou virais, além de englobar outras condições, como de manejo e ambiente, acometendo principalmente suínos nas fases de crescimento e terminação<sup>(6,7)</sup>.

O termo Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) descreve uma síndrome que engloba vários agentes bacterianos, dentre os quais *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), agente da Pneumonia Enzoótica dos Suínos; *Pasteurella multocida* responsável por pleurites e que, juntamente com *Bordetella bronchiseptica*, causam a Rinite Atrófica; *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente causador da Pleuropneumonia Suína, *Haemophilus parasuis*, agente da Doença de Glasser e *Streptococcus suis*, responsável por causar pneumonia e pleurite<sup>(7)</sup>.

O CDRS é conhecido mundialmente pela importância que representa para a suinocultura devido às grandes perdas econômicas decorrentes de mortalidade, de animais que se tornam refugos e da condenação de carcaças<sup>(1)</sup>. Pelo fato do impacto das condenações de carcaças ser significativo nos custos de produção, cada vez mais os sanitaristas têm aplicado os conhecimentos gerados por pesquisas para realizar o diagnóstico diferencial das lesões pulmonares, procurando correlacionar as lesões com o agente causal e buscar prevenção e cura para as enfermidades diagnosticadas<sup>(1,8)</sup>.

Tendo em vista as perdas econômicas que as doenças respiratórias representam para a suinocultura nacional, é fundamental conhecer os agentes bacterianos que desencadeiam esse processo. O objetivo do trabalho foi verificar se agentes bacterianos do CDRS causam perdas nos índices zootécnicos em suínos de terminação e de suínos ao abate.

## Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) e registrado sob o protocolo n.130/13, atendendo aos princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Foi selecionada uma granja de suínos do Estado de São Paulo com sistema de criação de ciclo completo. A criação foi realizada de forma extensiva na fase de gestação, semi-intensiva na fase de maternidade e intensiva nas demais fases. Os animais eram de linhagens híbridas de Landrace e Large White, foram

identificados por marcação australiana e pesados em duas fases de vida (nascimento e final da terminação). Houve fornecimento de ração balanceada com núcleo e premix, formulados por empresa de nutrição animal (Agroquímica). A limpeza e desinfecção das instalações foram realizadas diariamente. Os leitões foram vacinados com Respisure® One (bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* inativado quimicamente) e/ou Circumvent® PCV M (*Mycoplasma hyopneumoniae* inativado + ORF2 de Circovirus suíno 2) e com vacina Suivem® (controle de pasteurelose, paratifo, erisipela, rinite atrófica, leptospirose e colibacilose). Os dados de peso ao nascimento e terminação foram tomados na própria granja, enquanto que as carcaças quentes e limpas foram pesadas no abatedouro.

No abate foram colhidas 115 amostras de sangue total, fragmentos de pulmão e linfonodos mediastínicos.

Para a investigação soropidemiológica de *A. pleuropneumoniae*, utilizou-se o teste de ELISA para detecção de anticorpos (IDEXX APP-ApxIV Ab Teste, IDXX Laboratories Inc, EUA).

No momento do abate, foram colhidos fragmentos dos pulmões e linfonodos mediastínicos com lesões macroscópicas, uma parte mantida sob refrigeração para o isolamento bacteriano e outra fixada em formol 10% tamponado para o histopatológico.

O procedimento histotécnico consistiu em desidratação, diafanização, emblocagem em parafina, microtomia e coloração por hematoxilina/eosina (HE)<sup>(9)</sup>. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico comum para diagnóstico histopatológico.

O isolamento bacteriano foi feito a partir de amostras de pulmão e linfonodos, os quais foram suspensos em solução salina 0,85% estéril e 1 mL desse conteúdo foi adicionado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para enriquecimento da amostra. Após enriquecimento, 10µL da suspensão foram semeados em ágar sangue de carneiro 5% e incubados por 48 horas a 37°C. Nas amostras em que houve crescimento bacteriano neste meio, foram observadas características morfológicas das colônias como tamanho, forma, coloração, presença e tipo de hemólise. A seguir, realizou-se a bacterioscopia, corando-se pelo método de Gram esfregaços das diferentes colônias, observando ao microscópio óptico comum a morfologia, a disposição das células e as características tintoriais ao Gram<sup>(10)</sup>. As espécies bacterianas foram identificadas através de provas bioquímicas específicas para cada agente<sup>(10, 11)</sup>. O isolamento de *Streptococcus* sp foi realizado somente a nível de gênero.

A biologia molecular utilizou a PCR multiplex para detecção de *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* e *H. parasuis*, e nested PCR para detecção de Mhyo. A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de pulmão e linfonodos utilizando kit comercial (Quick-gDNA™ MiniPrep, Uncapped Columns, Zymo Research, EUA).

Para a confiabilidade das análises de biologia molecular, confirmou-se a extração de DNA por meio da PCR para o gene da  $\beta$  actina<sup>(12)</sup>. Este protocolo utiliza *primers* específicos para a espécie suína (Actin F-TGAGACCTTCAACACGCC/Actin R-ATCTGCTGGAAGGTGGAC), com tamanho de 745 pares de base (pb). Para a reação da PCR, 2,5 µL de amostra de DNA extraído foram adicionados em 22,5µL de Mix da PCR, contendo 1,25 U Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl), 0,75mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 pmol de cada *primer*. O processo de amplificação foi realizado em termociclador, com as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos; 39 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 56 °C durante 45 segundos e 72 °C por 45 segundos; para a extensão final foram 72 °C por 5 minutos.

Na PCR multiplex foram empregados *primers* específicos para cada agente: *A. pleuropneumoniae* (AP-IVF: ATA CGG TTA ATG GCG GTA ATG G/AP-IVR: ACC TGA GTG CTC ACC AAC G)<sup>(13)</sup>, *P. multocida* (KMT1 T7: ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG/KMT1 SP6: GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC)<sup>(14)</sup>, *H. parasuis* (HPS-F: GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT/HPS-R: GGC TTC GTC ACC CTC TGT)<sup>(15)</sup>, os quais amplificam um segmento de 346, 460 e 821 pb, respectivamente. Estes *primers* foram utilizados na PCR multiplex por Hričínová et al.<sup>(16)</sup>. Como controle positivo de *A.*

*pleuropneumoniae*, foram utilizadas amostras padrão dos sorotipos I, III e Va liofilizada, fornecida pela Empresa Irfa Química e Biotecnologia Industrial Ltda<sup>(17)</sup>; para *H. parasuis*, foi utilizada amostra cedida pela profa. Dra. Andrea Mike Moreno, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ USP, São Paulo, SP, Brasil e cepa de *P. multocida* INCQS 00096 (ATCC 6530) da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. A amostra negativa foi água ultra-pura. A amplificação das amostras foi realizada com a utilização de 10 µL do DNA extraído, acrescido de 40 µL da mistura dos reagentes contendo 1,25 U Taq DNA polimerase, 1X PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl), 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 30 pmol de cada *primer*. O processo de amplificação foi realizado em termociclador, de acordo com as seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com um ciclo a 95 °C por 5 minutos, seguido de 29 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, hibridização dos *primers* com a temperatura de 58 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Depois de completados os 29 ciclos, uma etapa final consistia do aquecimento de 72 °C por 7 minutos para a extensão final.

A *nested* PCR para Mhyo utilizou *primers* externos (A-F: GAGCCTTCAAGCTTCACCAAGA / B-R: GTGTTAGTGACTTTTGCCACC)<sup>(18)</sup> e internos (C-F: ACTAGATAGGAAATGCTCTAGT / D-R: GTGGACTACCAGGGTATCT)<sup>(19)</sup>, tendo como tamanho dos fragmentos 649 pb e 352 pb, respectivamente. Para a realização da PCR, a solução de reagentes do mix consistiu de 1,0 U Taq DNA polimerase; 10 pmol de cada *primer* (Mhyo A-F e Mhyo B-R); 200 µM de cada dNTP; 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1X PCR Buffer (20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl) e 5 µL de DNA extraído. Como controle positivo foi utilizado DNA de Mhyo, cedido pela Profa. Dra. Andrea Mike Moreno, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ USP, São Paulo, SP, Brasil; o controle negativo foi água ultra-pura. Os ciclos de temperatura foram de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e meio, encerrando com aquecimento de 72 °C por 5 minutos para a extensão final. Na *nested* PCR, a solução de reagentes foi idêntica à PCR, substituindo-se apenas o par de *primers* (Mhyo C-F e Mhyo D-R) e tendo alteração da temperatura de hibridização, passando de 64 °C para 60°C.

Para todas as reações biomoleculares, os produtos amplificados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta (UV) após eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™. Os fragmentos amplificados foram comparados com o padrão de tamanho molecular (100bp DNA Ladder Invitrogen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas. A imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a um computador.

A análise de variância considerou a infecção conjunta de *Streptococcus* sp e Mhyo, ou somente Mhyo. Foram avaliadas as variáveis zootécnicas: peso no nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao abate (GMD), peso do suíno final de terminação (PF), e peso da carcaça após abate (PCAR), associada às fontes de variação: sexo (macho e fêmea), doença (positivo ou negativo), idade (em dias) e lesões macro e microscópicas. Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se o modelo misto e, para os efeitos aleatórios de lote e resíduo, foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (versão 9.3)<sup>(20)</sup>. Quando significativa, as médias entre tratamentos foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher (i.e., a opção DIFF do comando LSMEANS). Em todas as análises a significância foi declarada à  $P \leq 0,05$ .

## Resultados e discussão

O diagnóstico de *A. pleuropneumoniae* foi realizado por diferentes técnicas: a sorologia por ELISA, por apresentar facilidade na execução e boa sensibilidade<sup>(21)</sup>, porém, nenhum animal apresentou anticorpos.

Alguns animais podem apresentar sorologia negativa e carrear *A. pleuropneumoniae* nas cavidades nasais e tonsilas sem apresentarem sinais clínicos, mostrando que o agente pode colonizar o trato respiratório superior sem indução da soroconversão<sup>(22, 23)</sup>. Por este motivo foram realizadas análises bacteriológicas, e não houve isolamento e nem detecção pela PCR desta bactéria.

A PCR multiplex foi negativa para *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* e *H. parasuis*<sup>(15)</sup>. Provavelmente esse resultado foi encontrado devido ao status sanitário da granja ser bem controlado e os animais não apresentaram lesões pulmonares macroscópicas características destas doenças.

Diferentes gêneros bacterianos foram isolados a partir das amostras de pulmão e linfonodos (Tabela 1), porém o único gênero que apresenta significado importante para doenças respiratórias em suíno é o *Streptococcus* sp, com 14,78% (17/115) animais positivos. No exame de cultivo bacteriológico, existe uma dificuldade básica no diagnóstico pelo uso intensivo de antibióticos para controlar diferentes enfermidades em suínos, podendo ser considerado um dos principais motivos pelo qual não foi possível o isolamento de variedades importantes de bactérias para a ocorrência de problemas respiratórios. Além disso, esse fato pode aumentar a chance da ocorrência de problemas de resistência bacteriana a antimicrobianos.

Nos 14,78% (17/115) suínos positivos a ambos patógenos *Streptococcus* sp e Mhyo, as lesões macroscópicas foram marmoreio (58,82%), edema (11,76%), hemorragia (11,76%), pulmão friável (23,53%), pálido (23,53%) e petéquias (5,88%). Nestes animais não foi observado enfisema, atrofia, pálido, aderência de pleura e pericardite (Tabela 2).

Nos animais positivos ao Mhyo – 98,26% (113/115) (Tabela 2), as lesões macroscópicas foram marmoreio (63,72%), edema (29,20%), hemorragia (12,39%), friável (11,50%), pálido (10,62%), enfisematoso (6,19%), atrofia (3,54%), petéquias (2,65%), aderência de pleura (0,88%) e pericardite (0,88%), sendo que estas lesões são compatíveis com Mhyo, conforme descrito por outros autores<sup>(2, 8, 24)</sup>.

**Tabela 1.** Bactérias isoladas em linfonodos pulmonares e ou fragmentos de pulmões com lesões microscópicas

Bactérias isoladas	Número total de isolados (%)
<i>Bacillus</i> sp	46 (29,30)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	35 (22,29)
<i>Escherichia coli</i>	30 (19,11)
<i>Streptococcus</i> sp	17 (10,83)
Enterobactéria	12 (7,64)
<i>Pantoea agglomerans</i>	5 (3,18)
Gram negativo não fermentador	5 (3,18)
<i>Serratia liquefaciens</i>	2 (1,27)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (1,27)
<i>Trueperella pyogenes</i>	1 (0,64)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0,64)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,64)
<b>Total</b>	<b>157 (100,0)</b>

**Tabela 2.** Lesões macroscópicas pulmonares encontradas nos suínos positivos ao *Streptococcus* sp e Mhyo, considerando infecção mista, positivo ao Mhyo e negativo ao *Streptococcus* sp, e total de positivos ao Mhyo

Lesões Macroscópicas Pulmonares	Positivo	Positivo	Total
	<i>Streptococcus</i> sp e Mhyo	Mhyo e negativo <i>Streptococcus</i> sp	Animais positivos Mhyo (%)
	Total (%)	Total (%)	
Marmoreio	10 (58,82)	62 (54,87)	72 (63,72)
Edema	2 (11,76)	31 (27,43)	33 (29,20)
Hemorragia	2 (11,76)	12 (10,62)	14 (12,39)
Friável	4 (23,53)	9 (7,96)	13 (11,50)
Pálido	4 (23,53)	8 (7,08)	12 (10,62)
Enfisematoso	0 (0,00)	7 (6,19)	7 (6,19)
Atrofia	0 (0,00)	4 (3,54)	4 (3,54)
Petéquias	1 (5,88)	2 (1,77)	3 (2,65)
Aderência de pleura	0 (0,00)	1 (0,89)	1 (0,88)
Pericardite	0 (0,00)	1 (0,89)	1 (0,88)
Total animais positivos/total animais examinados	17/115 (14,78)	113/115 (98,26)	113/115 (98,26)

\*Mhyo - *Mycoplasma*

Com relação à análise de variância das lesões macroscópicas e características de desempenho, o pulmão enfisematoso afetou significativamente o PF ( $p=0,0041$ ) e o PCAR ( $p=0,0012$ ) (Tabela 3). As demais lesões macroscópicas não afetaram nenhuma outra característica de desempenho. Observa-se uma média de peso menor nos animais que apresentaram enfisema pulmonar, tanto no PF (65,84 kg) como no PCAR (49,46 kg), comparado aos animais sem lesão macroscópica, que apresentaram maior PF (80,70 kg) e PCAR (64,65 kg).

**Tabela 3.** Resumo do quadro de Análise de Variância para as fontes de variação PF e PCAR, e pulmão enfisematoso

Fontes de variação	Tipo de lesão macroscópica	Sem lesão	Com lesão	Pr > F
		Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	
PF	enfisematoso	80,70 ± 1,26	65,84 ± 4,91	0,0041
PCAR	enfisematoso	64,65 ± 1,13	49,46 ± 4,42	0,0012

\*PF - peso do suíno no final da terminação;

\*\*PCAR - peso da carcaça quente após abate;

\*\*\*A análise de variância utilizou o programa estatístico SAS versão 9.3<sup>(20)</sup>, erro alfa 5%.

As CDRS são doenças obstrutivas e estão associadas a enfisema, e esta condição alterou significativamente o PF e PCAR dos animais. É importante salientar que a capacidade respiratória adequada é fundamental para o crescimento e engorda dos suínos<sup>(25)</sup>, sendo que as desordens respiratórias constituem um dos problemas mais importantes na suinocultura moderna, pelas perdas econômicas ocasionadas pela mortalidade, animais que se tornam refugos e condenação de carcaças<sup>(1)</sup>.

Nos 14,78% (17/115) suínos com infecção mista *Streptococcus* sp x Mhyo (Tabela 4), as lesões microscópicas foram: espessamento da pleura interlobular (100,0%) e visceral (70,59%), fibrina intersticial (100,0%), espessamento dos septos alveolares (100,0%), infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (88,24%) ou peribronquiolar (82,35%), enfisema (76,47%), debris celulares no lúmen dos bronquíolos (41,18%), edema (70,59%), macicez pulmonar (35,29%), macrófagos espumosos (35,29%), neutrófilos no parênquima e lúmen dos bronquíolos (33,29%) e hemorragia intersticial (23,53%).

Nos animais positivos ao Mhyo (Tabela 4), as lesões microscópicas foram: espessamento da pleura

interlobular (95,57%) e visceral (69,91%); fibrina intersticial (94,69%); espessamento dos septos alveolares (93,81%); infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (93,81%) ou peribronquiolar (92,04%); enfisema (83,19%); debris celulares no lúmen dos bronquíolos (66,37%); edema (61,06%); macicez pulmonar (51,33%); macrófagos espumosos (42,48%); neutrófilos no parênquima e lúmen dos bronquíolos (40,71%) e hemorragia intersticial (31,86%), sendo que estas lesões são compatíveis com Mhyo, conforme descrito por outros autores<sup>(8, 24)</sup>.

O Mhyo foi diagnosticado por *nested* PCR em 98,26% (113/115) dos animais, tanto nos com discretas lesões pulmonares como naqueles com grau de severidade moderada a elevada e pericardite. Tendo em vista que os suínos foram vacinados com o patógeno inativado ainda na fase de leitão, a presença do DNA de Mhyo pode indicar infecção assintomática (colonização), no caso em que as lesões pulmonares foram mínimas, quando o agente se manteve, mas não em suficiente quantia para causar doença<sup>(26)</sup>. Este resultado também demonstrou a presença de infecção ativa na granja, pois mesmo vacinados para Mhyo, muitos suínos apresentaram lesões compatíveis, inclusive um animal apresentou aderência de pleura e pericárdio no gradil costal, lesões crônicas de extrema gravidade.

As vacinas comerciais existentes no mercado nacional contra o Mhyo não utilizam as cepas isoladas no Brasil. Estas vacinas demonstraram ser efetivas na redução dos sinais clínicos, mas somente uma proteção parcial contra o desenvolvimento de lesões e na transmissão do agente tem sido obtida. Elas não previnem a colonização do Mhyo no trato respiratório dos suínos e não reduzem a transmissão do patógeno, sendo que há estudos que questionam sua eficácia<sup>(27)</sup>, o que também foi constatado no presente estudo. Ainda, a pressão de infecção pode ser muito alta, a ponto da vacina não gerar imunidade suficiente para neutralizar a infecção.

**Tabela 4.** Lesões microscópicas pulmonares encontradas nos suínos positivos ao *Streptococcus* sp e Mhyo, considerando infecção mista, positivo ao Mhyo e negativo ao *Streptococcus* sp, e total positivos ao Mhyo

Lesões Microscópicas Pulmonares	Positivo <i>Streptococcus</i> sp e Mhyo Total (%)	Positivo Mhyo e negativo <i>Streptococcus</i> sp Total (%)	Total animais positivos Mhyo (%)
Espessamento da pleura interlobular	17 (100,00)	91 (80,53)	108 (95,57)
Espessamento da pleura visceral	12 (70,59)	67 (59,29)	79 (69,91)
Fibrina intersticial	17 (100,00)	90 (79,64)	107 (94,69)
Espessamento dos septos alveolares	17 (100,00)	89 (78,76)	106 (93,81)
Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial	15 (88,24)	91 (80,53)	106 (93,81)
Infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar	14 (82,35)	90 (79,64)	104 (92,04)
Enfisema	13 (76,47)	81 (71,68)	94 (83,19)
Debris celulares no lúmen dos bronquíolos	7 (41,18)	68 (60,18)	75 (66,37)
Edema	12 (70,59)	57 (55,44)	69 (61,06)
Macicez pulmonar	6 (35,29)	52 (46,02)	58 (51,33)
Macrófagos espumosos	6 (35,29)	42 (37,17)	48 (42,48)
Neutrófilos no parênquima e lúmen dos bronquíolos	6 (35,29)	40 (35,40)	46 (40,71)
Hemorragia intersticial	4 (23,53)	32 (28,32)	36 (31,86)
Total animais positivos/total animais examinados	17/115 (14,78)	113/115 (98,26)	113/115 (98,26)

\*Mhyo – *Mycoplasma*

Os achados macroscópicos e microscópicos evidenciaram que a presença de Mhyo em associação ou não com *Streptococcus* sp causa sérias lesões pulmonares.

O controle do Mhyo consiste na adoção de medidas de biossegurança e vacinação, porém há falhas na imunização devido à diferença entre a cepa vacinal e a de campo. Um estudo realizado no Estado de Minas Gerais, Brasil, demonstrou a diversidade genética de amostras de campo de Mhyo oriundas de pulmões de suínos<sup>(28)</sup>. Essas amostras foram caracterizadas em 30 grupos genéticos, com ampla distribuição nas regiões estudadas. Além da PCR, a histopatologia foi realizada e todas as amostras analisadas tiveram lesões sugestivas de Pneumonia Enzoótica dos Suínos. Os resultados indicaram que diversas variantes de Mhyo estão circulando em rebanhos suínos, sugerindo ampla diversidade genética dessa bactéria, até mesmo dentro de uma mesma região no Estado de Minas Gerais. Os autores concluem ser necessária a investigação sobre antígenos protetores e estratégias na elaboração de protótipos vacinais contra a infecção por Mhyo.

O Mhyo causa a Pneumonia Enzoótica dos Suínos, broncopneumonia catarral, considerada uma das principais doenças infecto-contagiosas em suínos no mundo e causadora de perdas econômicas significativas<sup>(29)</sup>. Dentre as principais medidas de controle recomendadas para a Pneumonia Enzoótica dos Suínos, a vacinação é fator fundamental. Entretanto, as vacinas comerciais disponíveis no Brasil são constituídas de células inteiras inativadas de Mhyo, e é questionado se essa cepa vacinal possui características semelhantes com as cepas circulantes nos rebanhos suínos em outras partes do mundo<sup>(30, 31)</sup>.

Técnicas moleculares têm demonstrado a grande diversidade genética de Mhyo<sup>(30-36)</sup>, variedades proteômicas<sup>(37)</sup> e diferenças na virulência<sup>(38)</sup>. As vacinas comerciais existentes no mercado são constituídas de células inteiras inativadas de Mhyo e são utilizadas no mundo todo. Essas vacinas demonstraram ser efetivas na redução dos sinais clínicos, mas apresentam somente uma proteção parcial contra o desenvolvimento de lesões e na transmissão do agente, pois não previnem a colonização do Mhyo no trato respiratório dos suínos e não reduzem a transmissão do patógeno, sendo que há estudos que questionam sua eficácia<sup>(27)</sup>, o que também foi constatado no presente estudo. Ainda, a pressão de infecção pode ser muito alta, a ponto da vacina não gerar imunidade suficiente para neutralizar a infecção. É preciso considerar que as vacinas comerciais disponíveis no Brasil são bacterinas que utilizam uma cepa isolada na Inglaterra e, portanto, é questionável se essa cepa tem características semelhantes com as cepas de Mhyo circulantes nos rebanhos suínos em outras partes do mundo<sup>(30, 31)</sup>.

A análise de variância demonstrou diferenças estatisticamente significativas (erro alfa 0,05) para as fontes de variação: ganho de peso do nascimento ao abate (GMD); peso do suíno no final da terminação (PF) e peso da carcaça após abate (PCAR), sendo maiores nos suínos em que se observou infecção mista por *Streptococcus* sp e Mhyo (PCAR), porém não houve interferência no peso no nascimento (PN) (Tabela 5), independentemente do sexo (macho e fêmea) e da idade (em dias). A média do PN dos animais com infecção mista *Streptococcus* sp e Mhyo foi 1,91 kg, enquanto que dos animais positivos, somente para Mhyo foi 1,75 kg, não havendo interferência da doença no peso ao nascimento já que esta enfermidade apresenta período de incubação longo, iniciando a manifestação clínica a partir da fase de creche. O número extremamente baixo de suínos sem a infecção por Mhyo na granja estudada não permitiu que a análise de variância comparasse os índices produtivos de um grupo de controle negativo com os animais infectados por um ou ambos agentes, e por esse motivo não se pode depreender se houve interferência dos patógenos nestes índices zootécnicos e quantificar esta interferência.

A publicação *Boas práticas de produção de suínos*, da Embrapa<sup>(39)</sup>, estabelece os índices

zootécnicos: limite de peso médio dos leitões ao nascimento de 1,4 kg, sendo ideal acima de 1,5 kg; peso médio dos suínos na saída da terminação para o abate, aos 133 dias de idade, de 78 kg, sendo ideal acima dos 83 kg; aos 140 dias, acima de 85 kg, sendo ideal acima de 90 kg; aos 147 dias, de 92 kg, sendo ideal acima dos 97 kg; aos 154 dias, de 98 kg, sendo ideal peso superior a 103 kg. Segundo a Tabela 5, tanto os animais positivos apenas ao Mhyo quanto a Mhyo e *Streptococcus* sp apresentaram PF (período médio de 137 dias) semelhante aos valores da Embrapa<sup>(39)</sup>. Devemos ressaltar que a granja não era tecnificada e não possuía como objetivo a produção comercial de um sistema intensivo (suinocultura industrial) em larga escala. Apesar do estudo da Embrapa<sup>(39)</sup> não ter considerado a infecção de patógenos causadores de CDRS nas granjas avaliadas, para se avaliar a interferência da Pneumonia Enzoótica dos Suínos nos índices zootécnicos é necessário ter grupo de animais sem Mhyo, o que não foi possível obter na presente pesquisa porque quase 100% dos suínos estavam infectados pelo Mhyo.

**Tabela 5.** Análise de variância. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais positivos apenas para Mhyo ou infectados por ambos os agentes (*Streptococcus* sp e Mhyo), segundo as fontes de variação PN, GMD, PF e PCAR

Fontes de variação	Positivo apenas ao Mhyo Média ± desvio padrão	Positivo Mhyo e <i>Streptococcus</i> sp Média ± desvio padrão	Pr > F
PN	1,75 ± 0,03	1,91 ± 0,08	0,0633
GMD	0,56 ± 0,01	0,61 ± 0,02	0,0030
PF	78,42 ± 1,34	87,65 ± 3,19	0,0088
PCAR	62,57 ± 1,23	70,12 ± 2,92	0,0190

\*Mhyo – *Mycoplasma*

\*\*Análise de variância calculada utilizando o programa estatístico SAS versão 9.3<sup>(20)</sup>, considerando as variáveis zootécnicas PN (peso no nascimento), GMD (ganho de peso do nascimento ao abate, PF (peso do suíno no final da terminação aos 137 dias), e PCAR (peso da carcaça quente após abate. Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se o modelo misto e, para os efeitos aleatórios de lote e resíduo, foi empregado o procedimento MIXED do SAS. Quando significativa, as médias entre tratamentos foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher (i.e., a opção DIFF do comando LSMEANS). Em todas as análises a significância foi declarada à  $P \leq 0,05$ .

Foi possível constatar por este estudo que a vacina contra micoplasmose suína não foi eficaz na prevenção da infecção do Mhyo e tampouco na prevenção de lesões crônicas, sendo necessário o desenvolvimento de imunógenos eficazes e testes com cepas circulantes no Brasil, a fim de combater a Pneumonia Enzoótica dos Suínos.

Foi avaliada a prevalência e impacto econômico das doenças respiratórias dos suínos em 62 granjas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná<sup>(25)</sup>. Também no presente trabalho, foram acompanhados lotes de suínos de ambos os sexos, escolhidos ao acaso, desde início do alojamento até o abate. Os animais foram abatidos e avaliados 3.788 pulmões quanto a frequência e extensão do comprometimento com pneumonia, e 3.837 cabeças quanto a frequência e gravidade de destruição dos cornetos nasais. A pneumonia foi diagnosticada em 2079 (54,9%) animais, e a rinite atrófica em 1894 (49,4%), sendo grau leve de lesão em 42,6% dos casos de Pneumonia e 32,4% para Rinite Atrófica. Apesar da maioria dos animais não ter manifestado clínica evidente, houve redução no ganho de peso médio diário de 6% para a Rinite Atrófica e entre 3 a 8% para a Pneumonia, comprovando o impacto de doenças respiratórias sobre a produtividade dos animais.

Um outro estudo avaliou casos clínicos de doenças respiratórias em suínos de terminação<sup>(40)</sup>. Animais com sinais clínicos respiratórios evidentes foram necropsiados para avaliação macroscópica e colheita de amostras para análise histopatológica e microbiológica. Foi realizado isolamento bacteriano para bactérias do sistema respiratório dos suínos, *Mycoplasma hyorhinis*,

imuno-histoquímica para Influenza A, Circovirus suíno tipo 2 e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Broncopneumonia supurativa e pleurite foram as principais lesões respiratórias encontradas, e o *Mycoplasma hyopneumoniae* e a *Pasteurella multocida* tipo A os patógenos mais prevalentes. A *Pasteurella multocida* tipo A, quando presente, aumentou a extensão das lesões pulmonares. Em 58% das amostras foi identificado mais de um agente infeccioso, e esse estudo também evidenciou importante associação de agentes nas doenças respiratórias de suínos em terminação.

A associação de patógenos torna mais difícil o controle destas infecções, sendo essencial diagnosticar os agentes e avaliar conjuntamente patologia, etiologia e quadro clínico em suínos na terminação no Brasil. A quantificação das perdas produtivas é necessária a fim de justificar o desenvolvimento de medidas profiláticas nas granjas<sup>(40, 41)</sup>.

## Conclusão

A presença de Mhyo associado ou não ao *Streptococcus* sp foi suficiente para causar lesões macroscópicas e microscópicas que levaram a perdas produtivas relacionadas ao peso ao abate e da carcaça.

## Agradecimentos

À Capes pela bolsa de mestrado e à FAPESP (bolsa mestrado processo número: 2013/07964-5 e apoio financeiro). Ao Sr. Lindolfo Rocha, da empresa ABASE Comércio e Representações Ltda., Jaguariúna, SP, Brasil, pela doação do kit de ELISA App Iddexx. À Profa. Dra. Andrea Mike Moreno, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ USP, São Paulo, SP, Brasil, por ter cedido as cepas de referência de *Haemophilus parasuis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*. À Empresa Irfa Química e Biotecnologia Industrial Ltda., por ter cedido as amostras padrão de *A. pleuropneumoniae* sorotipos I, III e Va.

## Referências

1. Paladino ES, Gabardo MP, Lunardi PN, Morés N, Guedes RMC. Anatomopathological pneumonic aspects associated with highly pathogenic *Pasteurella multocida* in finishing pigs. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2017;37(10):1091-1100.
2. Alberton GC, Mores MAZ. Interpretação de lesões no abate como ferramenta de diagnóstico das doenças respiratórias dos suínos. Acta Scientiae Veterinariae. 2008;36(1):95-99.
3. Krabbe EL, Santos Filho JI, Miele M, Martins FM. Embrapa Suínos e Aves. Tópicos atuais na produção de suínos e aves: Cadeias produtivas de suínos e aves. Pelotas: Instituto Federal Sul-rio-grandense; 2013. p. 9. Portuguese.
4. Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WI et al., ed. Diseases of swine. 8<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press; 1999. p. 913-940.
5. Sorensen V, Jorsal SE, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. (ed). Diseases of swine. 9<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p.149-177.
6. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice. 2001;17(5):551-565.
7. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. An investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. Journal of Clinical Pathology. 2010;143(2-3):120-131.

8. Mores MAZ, Donin DG, Cestari FK, Alberton GC. Achados patológicos e bacteriológicos em lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças de suínos. *Archives of Veterinary Science*. 2016;21(4):92-100. Portuguese.
9. Prophet EB, Mills B, Arrington J B, Sobin LH (Orgs.) Métodos Histotécnicos. Washington: Registro de Patologia de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, 1995. 280p. Spanish.
10. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1.ed. Porto Alegre: Artemed Editora SA, 2005. Portuguese.
11. Koneman EW, William MJ, Schreckenberger PC, Winn WC, Allen SD, Woods GL *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.1565p. Portuguese.
12. Hui RKH, Zeng F, Chan CMN, Yuen KY, Peiris JSM, Leung FCC. Reverse Transcriptase PCR Diagnostic Assay for the Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(5):p.1994-1999.
13. Xiao GS, Cao SJ, Duan LL, Wen XT, Ma XP, Chen HM. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes ApxIVA and OmIA. *Agricultural Sciences in China*. 2006;5(2):146-154.
14. Townsend KM, Frost AJ, Lee CHW, Papadimitriou JM, Dawkins HJ. Development of PCR assays for species- and type- specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(4):1096-1100.
15. Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2001;13(6):495-501.
16. Hričinová M, Holoda E, Mudroňová D, Ondrašovičová S. Multiplex PCR Assay for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* in lungs of pigs from a slaughterhouse. *Folia Microbiologica*. 2010;55(6):635-640.
17. Ferraz MICP, Ferreira DR, Goes AC, Gregori F, Miyashiro S, Ruiz VLA. Detecção direta de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em órgãos de suídeos do Estado de São Paulo pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (Nested-PCR). *Arquivos do Instituto Biológico*. 2010; 77(1):143-148. Portuguese.
18. Mattsson JG, Bergstrom K, Wallgreen P, Johansson KE. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(4):893-897.
19. Casalmiglia M, Pijoan C, Bosch GJ. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *Swine Health and Production*. 1999;7(6):263-268.
20. SAS Institute Inc. SAS® 9.3 Statements: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2011.
21. Gottschalk M, De Lasalle F, Radacovici S, Dubreuil JD. Evaluation of long-chain lipopolysaccharides (LPS-CL) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the serodiagnosis of swine pleuropneumonia. *Veterinary Microbiology*. 1994;38:315-327.
22. Sidibé M, Messier S, Lariviere S, Gottschalk M, Mittal KR. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1993;57(3):204-208.
23. Chiers K, Donné E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology*. 2002;85(4):343-352.
24. Sobestiansky J, Barcellos DESN, Mores N, Oliveira SJ, Carvalho LFOS, Moreno AM, Roehe PM. *Clínica e patologia suína*. 2ed., Goiânia, 1999. 464 p. Portuguese.
25. Sobestiansky J, Dalla Costa O, Mores N, Bariorini Junior W, Piffer IA, Guzzo R. Estudos ecopatológicos das doenças respiratórias dos suínos: prevalência e impacto econômico em sistemas de produção dos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná. Comunicado técnico: Embrapa, 2001. 6 p. [acesso 2014 Jan 12]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/439780/estudos->

[ecopatologicos-das-doencas-respiratorias-dos-suinos-prevalencia-e-impacto-economico-em-sistemas-de-producao-dos-estados-de-santa-catarina-rio-grande-do-sul-e-parana](#). Portuguese.

26. Tamiozzo PJ, Pelliza BR, Carranza AI, Ambrogi A. Monitoramento da presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em granjas de suínos durante a implementação de programas de erradicação. *Ciência Rural*. 2011;41(4):699-705. Portuguese.
27. 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*. 2004;100(3-4):255-268.
28. Moreira TS, Marques HZ, Souza LFL, Araújo EM, Assao VS, Santos MR, Moreira MAS, Silva Júnior A. Perfil Genético de *Mycoplasma hyopneumoniae* no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: Oliveira LG, Oliveira MEF, Mechler ML (Ed.). *Anais do II Simpósio Internacional de Produção e Sanidade de Suínos*. Jaboticabal: FCAV UNESP, 2017. p.172-175. ISSN 978-85-7805-170-9. ePDF. [acesso Out 2017]. Disponível em: <https://www.simpork.com/trabalhos-cientificos>. Portuguese.
29. Thacker, E. L.; Minion, F. C. *Mycoplasmosis*. In: Zimmerman, J.J; Karriker, L. A.; Ramirez, A. et al. (Eds.) *Diseases of swine*. 10<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press;2012. p.779-797.
30. Vranckx K, Maes D, Calus D, Villarreal I, Pasmans F, Haesebrouck F. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(5):2020-2023.
31. Stakenborg T, Vicca J, Maes D, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F, Butaye P. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Journal of Microbiological Methods*.2006;66(2):263-275.
32. Dos Santos LF, Sreevatsan S, Torremorell M, Moreira MA, Sibila M, Pieters M. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Veterinary Microbiology*. 2015;175(2-4):374-381.
33. Charlebois A, Marois-Créhan C, Hélie P, Gagnon CA, Gottschalk M, Archambault M. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Veterinary Microbiology*. 2014;168(2-4):348-356.
34. Nathues H, Beilage EG, Kreienbrock L, Rosengarten R, Spergser J. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Veterinary Microbiology*. 2011;152(3-4):338-345.
35. Strait EL, Madsen ML, Minion FC, Christopher-Hennings J, Dammen M, Jones KR, Thacker EL. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(8):2491-2498.
36. Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, Häni H, Kuhnert P. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary Microbiology*. 2004;102(1-2):55-65.
37. Calus, D.; Baele, M.; Meyns, T.; De Kruif, A.; Butaye, P.; Decostere, A.; Haesebrouck, F; Maes, D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2007;120(3-4):284-291.
38. Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology*. 2003;97(3-4):177-190.
39. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boas práticas de produção de suínos. 2006. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br>. Acessado em: 22 nov. 2014. Portuguese.
40. Morés MAZ, Oliveira Filho JX, Rebelatto R, Klein CS, Barcellos DEN, Coldebella A, Morés N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2015;35(8):725-733. Portuguese.
41. Alberton GC, Rocha DL. Como diagnosticar corretamente as doenças respiratórias dos suínos na recria e na terminação. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2010;38:29-35. Portuguese.