



**Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos**

**Luara Lucena Cassiano**

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

**Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos**

**LUARA LUCENA CASSIANO**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema  
Orientador: Dr. Marcio Hipolito

**São Paulo**

**Ano 2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Cassiano, Luara Lucena.

Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. / Luara Lucena Cassiano. – São Paulo, 2015.  
67 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Gestão sanitária e ambiental na produção animal.

Orientador: Marcio Hipolito.

Versão do título para o inglês: Implementation of molecular techniques and transmission electron microscopy for *Mycoplasma hyopneumoniae* research in swine.

1. *Mycoplasma hyopneumoniae* 2. Histopatologia 3. Microscopia eletrônica 4. Hibridização *in situ* 5. Imunoistoquímica I. Cassiano, Luara Lucena II. Hipolito, Marcio III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2015/008*

---

São Paulo  
Ano 2015



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252  
CEP 04014-002 - São Paulo - SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Luara Lucena Cassiano**

**Título:** Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos

**Orientador:** Dr. Marcio Hipolito

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em: 03 Junho 2015

**Banca Examinadora**

Assinatura: *Marcio Hipolito*

\*Prof. (a) Dr.(a): MARCIO HIPOLITO

\*Instituição: I. BIOLÓGICO

Assinatura: *Mônica de Campos Pinheiro*

\*Prof. (a) Dr.(a): Mônica de Campos Pinheiro

\*Instituição: Universidade Anhembi Morumbi

Assinatura: *Elaine Scarselli Pinheiro*

\*Prof. (a) Dr.(a): Elaine Scarselli Pinheiro

\*Instituição: Instituto Biológico

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a eu mesma, a minha família e a todas as pessoas que estiveram ao meu lado para que eu pudesse com muita persistência e dedicação terminar o meu mestrado e realizar um sonho.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador Dr. Marcio Hipolito por ter me acolhido, sempre deixando o laboratório a minha disposição, me auxiliando no meu crescimento científico e acreditando em minha capacidade de conquistar meu título de mestre.

A Dr. Ana Maria Cristina R. P. F. Martins, por toda a ajuda, apoio, incentivo e por ser uma incrível mentora em todos esses anos que eu estive no laboratório. Uma pessoa com a qual pude contar em todos os momentos, não só como mentora mas também como grande amiga, me aconselhando e direcionando nas ocasiões em que tive dificuldades.

Em memória a minha orientadora Dr. Magali D'angelo que me ajudou, orientou, incentivou e acreditou que eu mesmo em meio as dificuldades conseguiria conquistar meus objetivos. Passamos pouco tempo dividindo experiências, mas esse tempo foi suficiente para que ela se tornasse uma pessoa muito especial.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, força e capacidade para elaborar este trabalho.

Aos meus pais, irmã e sobrinho, pessoas que eu amo muito, João Roberto Cassiano, Lucia Cristiane Lucena, Bianca Lucena Cassiano e Leandro Cassiano Santos, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, fazendo a minha vida muito especial, sempre batalharam muito para me ajudar a conquistar meus sonhos. Principalmente para minha querida irmã que corrigiu toda a minha dissertação várias vezes!

Ao meu namorado Lucio A. R. Mendes pelo apoio, incentivo e ajuda. Sempre que necessário indo até o laboratório me ajudar para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Rodrigo Barbosa de Souza por sempre me ajudar, me aguentar, ser um amigo incrível e por me fazer acreditar que eu sou capaz de realizar os meus almejos!

A Fabiola de Souza por estar ao meu lado nos desesperos e correias que tivemos que enfrentar e pela ajuda nas minhas amostras na MET.

A todos os alunos da Pós Graduação do Instituto Biológico SP (turma 2013), pelas risadas, apoio e desesperos que passamos juntos e por ser uma turma inesquecível e muito unida.

A Dra. Márcia H. B. Catroxo, pela imensa ajuda na Microscopia Eletrônica de Transmissão, por sem ela não teria realizado as técnicas. Uma pessoa que pude contar em momentos difíceis.

A Dra. Josete G. Bersano, diretora da Sanidade Animal, por acreditar que era possível o desenvolvimento do meu projeto de mestrado e a todos do laboratório de Doenças de Suínos do Instituto Biológico, Renato A. Ogata e Talita Brombilla pois sem eles não teria conseguido coletar as amostras para dar seguimento ao projeto.

Ao Professor Dr. Ricardo Harakava e Amanda Aparecida de Oliveira por me acolherem em seu laboratório e me ajudarem no estudo molecular do meu projeto.

À Pós graduação do Instituto Biológico de São Paulo.

As agências de fomento CAPES e FAPESP.

## EPÍGRAFE

A ciência realmente só tem alcançado tornar  
mais intensa e forte uma certeza: - a velha  
certeza socrática da nossa irreparável  
ignorância. De cada vez sabemos mais – que  
não sabemos nada.

**CASSIANO, L.L. IMPLEMENTAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA PESQUISA DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EM SUÍNOS. São Paulo. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.**

## RESUMO

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) ou Pneumonia Micoplásmica Suína, causada pela bactéria fastidiosa *Mycoplasma hyopneumoniae*, é uma das principais doenças respiratórias dos suínos. *M. hyopneumoniae* destrói o principal mecanismo de defesa inespecífico do trato respiratório, o elevador mucociliar, pré-dispondo os suínos a patógenos secundários. Este estudo teve como objetivo desenvolver técnicas de imunoistoquímica, hibridização *in situ*, contrastação negativa e imunomarcção com ouro coloidal (MET) para detectar a presença do *M. hyopneumoniae* em amostras teciduais, contribuindo para posteriores exames de rotina dessa patogenia nos suínos no Estado de São Paulo. Utilizou-se 55 amostras de pulmões provenientes de um abatedouro e um matadouro. No estudo da histopatologia de rotina (H&E) dos pulmões observou-se a maior incidência de exsudato muco celular em 72,73% dos casos e a menor incidência espessamento da pleura com 12,73%. Em 7,27% os pulmões não apresentaram alterações histopatológicas. Identificou-se a presença do *Mycoplasma* em 22 amostras pela técnica da contrastação negativa (Microscopia eletrônica) e nessas 22 obteve-se a marcação do mesmo pela imunomarcção com ouro coloidal, através da utilização de anticorpo monoclonal. Na técnica de Imunoistoquímica, podemos observar a marcação antígeno-anticorpo em 41 animais, e pela Hibridização *in situ* 26 animais foram positivos na marcação do genoma confirmando a presença do *M. hyopneumoniae* no Estado de São Paulo. Como a profilaxia é idêntica entre os micoplasmas é a ocorrência da PES pode ou não ser observada, a técnica mais eficaz seria a da Microscopia Eletrônica de Transmissão. No entanto, como a quantidade empregada é muito diminuta, a melhor opção seria a combinação da contrastação negativa com a imunomarcção com ouro coloidal, para visualização e identificação do agente.

**Palavras-chave:** Pneumonia Enzoótica Suína, *Mycoplasma*, Histopatologia, Microscopia Eletrônica, hibridização *in situ*, imunoistoquímica.

**CASSIANO, L. L. IMPLEMENTATION OF MOLECULAR TECHNIQUES AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY FOR *Mycoplasma hyopneumoniae* RESEARCH IN SWINE. Dissertation (Master in Health, Food Safety and Environmental Agrobusiness) – Biological Institute.**

**ABSTRACT**

The Swine Enzootic Pneumonia (PES) or Mycoplasmal Swine Pneumonia, caused by the fastidious bacterium *Mycoplasma hyopneumoniae*, is one of the main respiratory diseases of swine. *M. hyopneumoniae* destroys the main nonspecific defense mechanism of the respiratory tract, the mucus ciliary elevator, predisposing pigs to secondary pathogens. The aim of this project is to develop techniques of Immunohistochemistry, *in situ* hybridization and negative staining and immunolabeling with colloidal gold (ME) to detect the presence of *M. hyopneumoniae* in tissue samples, contributing to further routine tests of pathogenicity in swine and, also, to know the extent of its presence and distribution in the State of São Paulo, and so collaborating with the National Swine Agribusiness. It was used in lungs of 55 samples from an abattoir and slaughtered. In routine histopathology study (H & E) of the lungs was observed a high erincidence of exudate cell mucus 72.73% of cases, and the lowest incidence of pleural thickening with 12.73%. 7.27% in the lungs showed no histopathological changes. It identified the presence of Mycoplasma in 22 samples by negative staining technique (electron microscopy) and these 22 was obtained by the same labeling with colloidal gold immune labeling, using monoclonal antibody. In immunohistochemistry technique, we can observe the antigen-antibody labeling in 41 animals, and by hybridization *in situ* had the positivity in the marking of the bacterial genome in 26 animals, so we can confirm the presence of *M. hyopneumoniae* in São Paulo. Due not have a difference in the prophylaxis, even if the difference between mycoplasmas mayor may not cause the PES, the technique that is shown to be more effective by TEM, though as a very small amount is used, the better would be the combination of negative staining with Immunohistochemistry with fresh material for viewing and agent identification.

**Key-words:** Swine enzootic Pneumonia, Mycoplasma, Histopathology, electronic microscopy, *in situ* hybridization, Immunohistochemistry.

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 - Fotomicrografia do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela técnica de contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão.....10
- Figura 2 - Gráfico da frequência das alterações histopatológicas.....28
- Figura 3 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina com presença de exsudato mucocelular no interior dos brônquios (seta preta) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....29
- Figura 4 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo falta de cílios nas células epiteliais do bronquíolo (seta preta) (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....29
- Figura 5 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, mostrando uma broncopneumonia intersticial (setas pretas) (barra 100  $\mu\text{m}$ ).....30
- Figura 6 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando consolidação pulmonar (asterisco) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....30
- Figura 7 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, com espessamento da parede alveolar (setas pretas) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....31
- Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo vaso congesto (seta preta) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....31
- Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo hemorragia com presença de hemossiderina

- (seta preta continua) e vaso arteriosclerosado (seta preta descontinua) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....32
- Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando hiperplasia do BALT (asterisco) e achatamento das vilosidades do brônquio (seta preta) (barra 50  $\mu\text{m}$ )..... 32
- Figura 11 - Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando espessamento da pleura (seta preta) (barra 20  $\mu\text{m}$ ).....33
- Figura 12 - A fotomicrografia **A** é de menor aumento de bronquíolo de pulmão de suíno (10x, barra 100  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **a**, é a ampliação de uma região da fotomicrografia **A**, exibindo a positividade da imunomarcção nas células epiteliais do bronquíolo (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....34
- Figura 13 - A fotomicrografia **A** é de um alvéolo pulmonar de suíno apresentando positividade da imunomarcção nas células da parede alveolar (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....34
- Figura 14 - Fotomicrografia de um rim de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcção no túbulo contorcido (setas pretas) (barra 50  $\mu\text{m}$ ).....35
- Figura 15 - Fotomicrografia de um fígado de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcção nos hepatócitos (setas pretas) (barra 50  $\mu\text{m}$ ).....35
- Figura 16 - Fotomicrografia de um linfonodo traqueobronquial superior esquerdo de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcção (setas

- vermelhas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....35
- Figura 17 - Fotomicrografia de uma artéria esclerosada do pulmão de suíno apresentando positividade com imunomarcção nas hemácias (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....35
- Figura 18 - A fotomicrografia **A** é de menor aumento de bronquíolo de pulmão de suíno (10x, barra 100  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **a**, é a ampliação de uma região da fotomicrografia **A**, exibindo a positividade, na marcação por meio da técnica de hibridização *in situ* nas células epiteliais do bronquíolo (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....36
- Figura 19 - A fotomicrografia **A** é de um alvéolo pulmonar de suíno apresentando marcação por meio da técnica de hibridização *in situ* nas células da parede alveolar (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de hibridização *in situ*, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).....36
- Figura 20 - Fotomicrografia do *Mycoplasma* pela técnica de contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão. Barra de 340 nm. **Fonte:** Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão Instituto Biológico SP.....37
- Figura 21 - Fotomicrografia da marcação do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela técnica de Imunocitoquímica com ouro coloidal na contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão. Barra de 260 nm (setas pretas). **Fonte:** Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão Instituto Biológico SP.....38

**LISTA DE QUADROS**

- Quadro 1 - Relação dos frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, locais onde foram realizadas as colheitas dos pulmões.....19
- Quadro 2 - Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina.....21
- Quadro 3 - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado de Jorge Michalany (1990).....22
- Quadro 4 - Protocolo reação PCR.....28
- Quadro 5 - Comparação dos resultados entre as técnicas.....39

**LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS**

PES	Pneumonia Enzoótica Suína
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ELISA	Enzyrna-linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)
IHQ	Imunoistoquímica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
PRDC	Complexo das Doenças Respiratórias em Suínos
SIV	Vírus influenza suíno
PRRSV	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína
UPL	Unidade produtora de leitões
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios
PCR	Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCV-2	Circovírus suíno tipo 2
CEDISA	Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
LISA	Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura
LME	Laboratório de Microscopia Eletrônica
H.E.	Hematoxilina e eosina
SIF	Sistema De Inspeção Federal
pb	Par de bases
Km	Quilômetros
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metros quadrados
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
mm	Milímetro
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1. A suinocultura no Brasil .....	5
3.2. Suinocultura no Estado de São Paulo com relação a PES .....	6
3.3. Doenças na suinocultura .....	7
3.4. Nova Instrução Normativa para PES .....	8
3.5. Pneumonia Enzoótica Suína .....	8
3.5.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	9
3.5.2. Epidemiologia e transmissão .....	11
3.5.3. Patogenia .....	12
3.5.4. Sinais clínicos e lesões .....	14
3.5.5. Controle e profilaxia .....	16
3.5.6. Técnicas atuais utilizadas para detecção de mycoplasmas.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1.Mateial .....	19
4.2. Métodos.....	19
4.2.1.Análise Macroscópica .....	19
4.2.2.Preparo dos pulmões para exame histológico .....	20

4.2.3.Preparo das laminas histológicas para coloração por H.E. ....	21
4.2.4.Preparo do material para Imunoistoquímica (IHQ).....	22
4.2.4.1.Protocolo para realização da IHQ utilizando o kit da Dako .....	22
4.2.5. Preparo do material para Hibridização <i>in situ</i> .....	23
4.2.5.1. Protocolo para realização da Hibridização <i>in situ</i> utilizando o kit da Dako.....	23
4.3. Análise Microscópica.....	25
4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	26
4.4.1. Técnica de Contrastação Negativa .....	26
4.4.2. Técnica de Imunocitoquímica Eletrônica (Imunomarcacão com partículas de ouro coloidal em contrastaçao negativa).....	26
4.5. Reaçao da Cadeia de Polimerase (PCR) .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	28
5.1. Análise Macroscópica .....	28
5.2. Análise Microscópica .....	28
5.3. Imunoistoquímica para detecção do <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	33
5.4. Hibridização <i>in situ</i> .....	36
5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	37
5.5.1. Contrastação negativa .....	37
5.5.2. Técnica de Imunocitoquímica Eletrônica (Imunomarcacão com partículas de ouro coloidal em contrastaçao negativa).....	37
5.6. Reaçao em Cadeia da Polimerase (PCR).....	38
5.7. Comparaçao dos resultados entre as técnicas utilizadas.....	38
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>9. ANEXOS</b> .....	56
9.1. Instruçao normativa nº50 de 24 de setembro de 2013 .....	57

9.2. Protocolo de extração de DNA pelo kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System .....	63
9.3. Certificado CETEA .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos e investimentos na suinocultura posicionaram o Brasil em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína. Alguns elementos como sanidade, nutrição, bom manejo da granja, produção integrada e, principalmente, aprimoramento gerencial dos produtores, contribuíram para aumentar a oferta interna e colocar o país em destaque no cenário mundial (MAPA, 2014).

Especialistas brasileiros também investiram na evolução genética da espécie por 20 anos, o que reduziu em 31% a gordura da carne, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa (MAPA, 2014).

Como consequência de investimento, a produção vem crescendo em torno de 4% ao ano, sendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores de suínos do país. Atualmente, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano (MAPA, 2014).

Esses fatores apontam para um crescimento ainda mais satisfatório: estima-se que a produção de carne suína atinja média anual de 2,84%, no período de 2008/2009 a 2018/2019, e o seu consumo, 1,79%. Em relação às exportações, a representatividade do mercado brasileiro de carne suína saltará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019 (MAPA, 2014).

A crescente industrialização abre novas oportunidades para agregar maior valor aos produtos derivados, gerando novos empregos e uma maior atividade econômica. No Brasil, o consumo de carne suína, ocorre 70% na forma de produtos industrializados sendo vendidos a preços superiores aos da carne *in natura*, o que pode representar um substancial retorno financeiro para os diferentes agentes econômicos envolvidos na cadeia produtiva.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2013 incluiu a Pneumonia Enzoótica Suína (PES) na lista de doenças de suínos de notificação mensal de qualquer caso confirmado, na Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro.

Considerando o status industrial da suinocultura, a PES possui alta morbidade e baixa mortalidade e as perdas econômicas são decorrentes de quedas na produtividade que podem chegar a 20% sobre a conversão alimentar e até 30% sobre o ganho de peso, dependendo da gravidade das lesões e das infecções secundárias (SOBESTIANSKY et al., 1999).

De acordo com o estudo de Sobestiansky(2001), em que foram avaliados 3.788 suínos de granjas da região sul do país, revelou que as perdas estimadas de peso devido a lesões pneumônicas, desde o nascimento ao abate, foram de 2,52kg/suíno abatido, o que leva a uma estimativa de perda de aproximadamente 80 milhões de reais por ano.

A fim de se evitar diagnóstico inconclusivo e controverso sobre a etiologia do processo, muitas vezes, o cultivo e o isolamento do agente tornam-se necessários. No entanto, por se tratar de um microrganismo de caráter fastidioso, de crescimento lento e que requer meio seletivo, complexo e de alto custo para o seu crescimento, as técnicas para seu isolamento não são rotineiramente utilizadas. Além disso, a utilização de antibióticos e outros quimioterápicos na alimentação podem também mascarar e comprometer os resultados desse procedimento microbiológico (HURNIKet al., 1993).

As técnicas sorológicas, dentre elas o ELISA, possuem alta sensibilidade, mas devido à ocorrência de reações cruzadas com *Mycoplasma flocculare* e *Mycoplasma hyorhinis*, possuem limitações quanto à sua utilização (ROSS e STEMKE, 1995). Os métodos sorológicos detectam os títulos de anticorpos, mas não confirmam a ocorrência de infecção. A imunofluorescência foi ocasionalmente utilizada para o diagnóstico de pneumonia enzoótica por ser barata, simples e prática (WHITFORD et al., 1994). Contudo, existem restrições ao seu uso, uma vez que requer amostras recentes do material a ser examinado em microscópio de luz ultravioleta, de custo elevado.

Os inconvenientes das técnicas citadas estimulam a busca de métodos compatíveis com os processos diagnósticos de rotina. Adicionalmente, em determinadas circunstâncias torna-se necessária a utilização de técnicas que possuam alta especificidade, capazes de detectar determinantes antigênicos envolvidos com a gênese do processo mórbido. A sensibilidade do método diagnóstico pode vir a ser importante ferramenta, capaz de monitorar o estado de hígidez de um rebanho e detectar um possível início da enfermidade, antes mesmo que a doença clínica se manifeste. A imunistoquímica (IHQ) e a hibridização *in situ*, ao combinarem técnicas morfológicas, imunológicas e bioquímicas, desponta como instrumento promissor para o diagnóstico de agentes infecciosos (GIMENO, 1995). Essas técnicas são facilmente exequíveis e de metodologia simples, e tem como vantagens a rapidez e o baixo custo, além de produzir material corado durável (HSUet al., 1981).

O desenvolvimento de técnicas de rotina de pesquisa da bactéria presente nos suínos nos abatedouros do Estado de São Paulo seria, portanto, de grande valia para a suinocultura. Neste aspecto, a Imunoistoquímica e Microscopia eletrônica (Técnica

de contração negativa; Técnica de Imunomicroscopia Eletrônica ou de Imunomarcção), se mostram ferramentas extremamente eficazes, pois permitem a visualização direta da bactéria além de avaliar as lesões causadas pelo *M. hyopneumoniae*, demonstrando não só a infecção, mas também o curso da doença na granja. A Hibridização *in situ* é, também, uma excelente ferramenta, pois permite a detecção de ácido nucléico bacteriano em tecido parafinizado e fixado em formalina (SIRINARUMITRet al., 2001).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Detectar a presença de micoplasma a partir de fragmentos pulmonares de suínos criados no Estado de São Paulo

### **2.2 Específicos**

- Padronizar e avaliar as técnicas diagnósticas: Hematoxilina e Eosina, microscopia eletrônica de transmissão: contrastação negativa e imunomarcacão com partículas de ouro coloidal, imunohistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ*.
- Implementar as técnicas para detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae*.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 A Suinocultura no Brasil**

No Brasil, a produção de carne suína existe desde os primórdios da nossa civilização e sua banha e carne vêm sendo utilizadas pela população brasileira desde então, tendo inicialmente apresentado um maior dinamismo em Minas Gerais (nas regiões de garimpo). A suinocultura ganhou um novo aliado no final do século XIX e início do século XX, com a imigração europeia para os estados do Sul. Esses imigrantes vindos principalmente da Alemanha e da Itália trouxeram para o Brasil os seus hábitos alimentares de produzir e consumir suínos, bem como um padrão próprio de industrialização (EMBRAPA, 2013).

A suinocultura até 1970 era uma atividade de duplo propósito. Além da carne, os suínos forneciam gordura para o preparo dos alimentos (esta inclusive era a demanda mais relevante). A partir de 1970, com o surgimento e difusão dos óleos vegetais, a produção de suínos como fonte de gordura perdeu espaço, sendo quase que totalmente eliminada do padrão de consumo da população brasileira. Para fazer face a esta transformação, os suínos passaram por uma grande transformação genética e tecnológica e desde então perderam banha e ganharam músculos (EMBRAPA, 2013).

Após 1978, a carne suína consolidou-se como a mais importante fonte de proteína animal do mundo. A produção mundial cresceu numa taxa anual de 3,1% nos últimos 46 anos. Neste período, a produção foi acrescida em 75,2 milhões de toneladas. Os 10 maiores produtores mundiais são China, que detém 43,95% do mercado, Estados Unidos (9,95%), Alemanha (4,98%), Espanha (3,54%), Brasil (3,26%), Vietnã (2,55%), França (2,28%), Polônia (2,15%), Canadá (1,89%) e Rússia (1,87%) (EMBRAPA, 2013).

Até o início do século XXI, enquanto a produção mundial cresceu a uma taxa de 3,3% ao ano, a produção nacional cresceu 2,6%. Somente a partir da última década do século XX, depois da abertura comercial que possibilitou o crescimento das exportações nacionais através do incremento de tecnologias no setor, é que a suinocultura nacional reverteu esta situação, tendo crescido a uma taxa anual de 5,7%, enquanto no resto do mundo este crescimento foi de somente 2,2% (EMBRAPA, 2013).

Existem dois principais fatores que são fundamentais para o comportamento negativo na produção suínica brasileira até 1990. O primeiro está relacionado a

nossa baixa inserção no comércio internacional e o segundo ao nosso baixo consumo per capita (EMBRAPA, 2013).

No caso das exportações nacionais, os problemas sanitários como a peste suína clássica (que afetou os rebanhos principalmente em Santa Catarina nos anos 1980), impediu a participação mais efetiva do Brasil no mercado internacional até o ano de 1999 (EMBRAPA, 2013).

Ainda que hoje o Brasil seja o 4º maior produtor mundial de carne suína, o consumo brasileiro fica abaixo da média mundial (16,5 kg em 2007). De fato, enquanto que o consumo per capita, em 2007, na União Europeia era de 44,3 kg, na China de 33,3 kg, nos Estados Unidos de 29,8 kg e no Japão de 19,4 kg, no Brasil foi de apenas 12,3 kg (EMBRAPA, 2013).

### **3.2 Suinocultura no Estado de São Paulo com relação a PES**

A suinocultura no Estado de São Paulo, diferentemente da praticada no Sul do país, não tem como característica em seu ciclo de existência a concentração em conglomerados de processamento, nos quais a produção de animais para o abate é obtida pelo sistema de integração aos abatedouros. As empresas de abate de suínos de São Paulo têm como objetivo principal o mercado estadual de carne resfriada, com exceção de alguns fabricantes de embutidos tradicionais e de qualidade diferenciada, cujo produto tem projeção nacional. Na suinocultura paulista, refere-se a pequenos, médios e alguns grandes produtores que enfrentam dificuldades em permanecer na atividade produtiva e temem pelo futuro do setor (IEA, 2014).

O número de suínos enviados para o abate por São Paulo em 2013 foi de aproximadamente 1,77 milhão de cabeças, cerca de 4,9% do total nacional, que é de 36,0 milhões de cabeças, conforme o Levantamento Trimestral da Produção Pecuária do IBGE, feito em março de 2014. A participação paulista na produção nacional vem decrescendo gradativamente. São Paulo aparece em quinto lugar, com 4,6%, de acordo com o rebanho nacional (IEA, 2014).

São Paulo conta com o total de 52 estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF) que abatem suínos, dos quais 49 estão ativos. Estas unidades, sob inspeção federal no Estado de São Paulo, foram responsáveis pelo abate de 1,44 milhão de suínos em 2013 (IEA, 2014).

Para o Estado de São Paulo existem poucas referências sobre o estudo da Pneumonia Enzoótica Suína, sendo o maior volume de estudos nos estados da Região Sul do país (BIONDO, 2012; FLECK, et al., 2004).

### 3.3 Doenças na Suinocultura

As doenças respiratórias em todo o mundo são enfermidades economicamente importantes que afetam a produção suína (CONCEIÇÃO e DELLAGOSTIN, 2006). Recentemente o termo Complexo das Doenças Respiratórias em Suínos (PRDC) tem sido adotado para descrever a doença respiratória grave, que se desenvolve como resultado da combinação de patógenos viral e bacteriano. Este complexo acarreta perdas econômicas significativas, caracterizadas por crescimento lento em função da piora na conversão alimentar, febre, anorexia, letargia, tosse e dispnéia dos animais. Essa síndrome surgiu em todas as regiões criadoras de suínos no mundo, apesar da contínua sanificação que é realizada em busca de uma melhor condição de saúde dos animais (DUBOSSON et al., 2004).

O impacto de doenças respiratórias de suínos no Brasil, mesmo com os esforços relacionados ao melhoramento genético e sanidade, realizados ao longo dos anos visando a maior produtividade, continua se mantendo. O termo PRDC também tem sido adotado para descrever uma doença respiratória severa que se desenvolve pela combinação de patógenos virais e bacterianos. Entre os principais agentes bacterianos e virais envolvidos no PRDC estão: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleuropneumonia suína), *Bordetella bronchiseptica* (rinite atrófica), o *Mycoplasma hyopneumoniae*, causador da Pneumonia Enzoótica Suína (PES) ou Pneumonia Micoplásmica Suína, o vírus influenza suíno (SIV), o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) e bactérias secundárias subsequentes (COSTA, 2002, KIM et al., 2003). Sendo a PES uma doença altamente contagiosa, de distribuição cosmopolita, caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, tosse crônica e retardo do crescimento (OBOEGBULEN, 1981).

As doenças respiratórias são muito comuns na suinocultura moderna, na qual os animais são criados em ambientes confinados, propiciando o acúmulo de gases e agentes patogênicos, pelo baixo rendimento dos animais, poucos gastos com tratamentos ou com investimentos em programas de prevenção e controle (STRAW et al., 1990; DOŠEN et al., 2007; MAES et al., 2008). Estudos de soroprevalência na Alemanha e na China demonstram que o agente da PES está presente em mais de 65% das granjas examinadas (GROSSE BEILAGE et al., 2009; HE et al., 2011).

### 3.4 Nova Instrução Normativa para PES

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) na Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013 (Anexo 1) tem uma lista de doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial.

Segue abaixo o tópico em que a PES foi inserida na normativa.

- Doenças que requerem notificação mensal de qualquer caso confirmado:
  - ✓ Circovirose
  - ✓ Erisipela suína
  - ✓ Influenza dos suínos
  - ✓ Parvovirose suína
  - ✓ Pneumonia enzoótica (*Mycoplasma hyopneumoniae*)
  - ✓ Rinite atrófica

Nota-se que a PES está relacionada na notificação mensal de qualquer caso confirmado da doença, devido a sua importância.

### 3.5 Pneumonia Enzoótica Suína

A Pneumonia Enzoótica Suína (PES) é uma doença muito contagiosa, infecciosa crônica, caracterizada por uma broncopneumonia catarral que geralmente cursa com complicações broncopulmonares purulentas e que se manifesta clinicamente por tosse seca e atraso no crescimento (SOBESTIANSKY et al., 1999). Afeta suínos de todas as idades, porém a forma clínica da doença é mais comum nos animais da fase de crescimento e terminação. A transmissão ocorre por contato direto, indireto e através de aerossóis eliminados durante os acessos de tosse. Variáveis ambientais e de manejo favorecem a sua ocorrência e severidade, por isso é considerada uma doença multifatorial.

É causada pelo agente etiológico *Mycoplasma hyopneumoniae* e é uma das mais importantes causas de perdas associadas a doenças em suínos. Atualmente é a principal enfermidade que acomete o sistema respiratório de suínos de produção intensiva em âmbito mundial e é a causa mais comum de perdas econômicas para os produtores e para a indústria, em função da piora na conversão alimentar, atraso no ganho de peso, predisposição à infecções secundárias, gastos excessivos com medicamentos e principalmente, condenação ou aproveitamento condicional de carcaças devido à alterações de pulmão e pleura (STRAW et al., 1999).

O período de incubação sob condições experimentais são de 10-16 dias. O *Mycoplasma hyopneumoniae* ataca primariamente o epitélio ciliado da traqueia, brônquios e bronquíolos e subsequentemente, causa danos a essas células epiteliais ciliadas (HAESEBROUCK et al., 2004).

A ocorrência da PES em suínos depende da presença da bactéria no ambiente de criação, associada a fatores de risco que condicionem o aparecimento da infecção e sinais clínicos (BARCELLO et al., 2007; MAES, 2010) fatores estes ligados a questões de manejo, do tipo de instalações ou dos próprios animais.

### 3.5.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

Os micoplasmas são diferenciados fenotipicamente de outras bactérias pelo diminuto tamanho e ausência de parede celular. São os menores organismos auto-replicantes conhecidos, possuem genomas pequenos (580 a 1350 kb), com baixo conteúdo de guanina + citosina (23-40%) e são filogeneticamente relacionados aos gêneros *Clostridium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (MANILOFF et al., 1992).

Pertencem à classe Mollicutes (mollis, mole; cutis, pele, em Latim), composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasmatales*, *Asteroplasmatales*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma*. A maioria dos membros desta classe é patogênica e coloniza uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais, plantas e insetos. Mas somente os membros do gênero *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são importantes na medicina veterinária. Sua morfologia é bastante pleomórfica em função da ausência da parede celular (Figura 1). A célula pode ser esférica, em forma de pera, em forma de espiral ou filamentosa, com diâmetro de forma esférica e varia de 0,3 a 0,8µm. Coram-se de forma insatisfatória pelo método de Gram, sendo recomendadas as colorações Giemsa, Castañeda, Dienes e novo azul de metileno. Possuem uma membrana trilaminar simples composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol, este último responsável pela rigidez e estabilidade osmótica da membrana (WALKER, 2003).

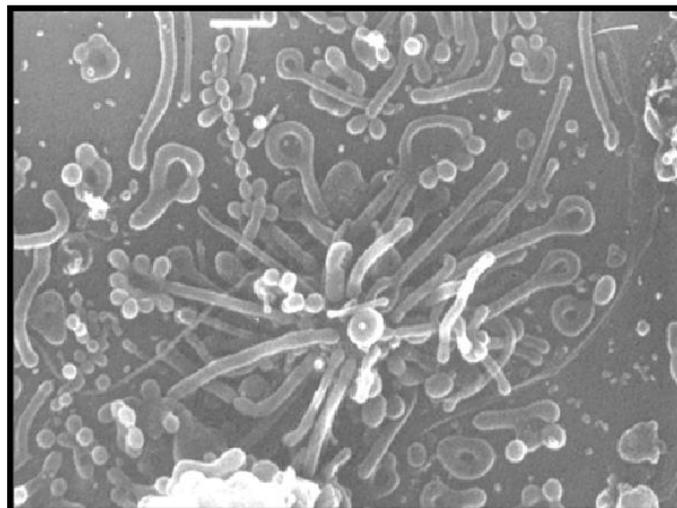
Os micoplasmas apresentam crescimento fastidioso entre 4 e 8 semanas (THACKER, 2006) em meios de cultura laboratoriais, necessitando pH entre 7,2 e 7,8 e meio específico com fatores de crescimento para que ocorra um crescimento efetivo (QUINN et al., 2004; WHITHEAR e BROWNING, 2004). Podem ser adicionados como inibidor de organismos competitivos no meio de cultura a penicilina, para bactérias Gram-positivas, e o acetato de tálio, para fungos e bactérias Gram-negativas. A

formação de microcolônias em forma de ovo frito com diâmetro entre 0,1 e 0,6 mm, e o crescimento para dentro do meio de cultura são características do agente em cultivo microbiológico.

Em suínos o *M. hyopneumoniae*, bactéria espécie-específica, tem o trato respiratório como local frequente de infecção. São bactérias capazes de produzir diversas substâncias, como hemolisinas e proteases, que acarretam na morte da célula hospedeira ou em uma infecção crônica (QUINN *et al.*, 2004), deixando o animal acometido em um estado de carreador (UNDERDAHL *et al.*, 1980). O agente apresenta uma elevada morbidade, que o capacita acometer vários suínos rapidamente. Com a destruição dos cílios e com o acúmulo de secreções inflamatórias e debriscelulares levando à predisposição do animal às infecções secundárias (BARCELLOS, 2006).

Portanto, a pneumonia causada exclusivamente pelo *M. hyopneumoniae* tem características brandas, contudo esta infecção primária resulta em sérios problemas ao animal afetado por haver imunodepressão do mesmo (WALKER, 1999).

Devido à falta de parede celular, os antimicrobianos que agem diretamente nesta estrutura ou na sua formação são ineficazes no controle dos micoplasmas, sendo necessário então o emprego de produtos que interfiram na síntese proteica ou dos ácidos nucleicos da bactéria. Esta característica colabora para o controle do *M. hyopneumoniae* no ambiente de criação, já que são organismos extremamente susceptíveis ao calor, detergentes e desinfetantes, como quaternário de amônio (WALKER, 1999).



**Figura 1** –Fotomicrografia do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela técnica de contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão.

**Fonte:** ICB – USP

[http://www.icb.usp.br/bmm/ext/index.php?option=com\\_content&view=article&catid=12%3Ageral&id=75%3Amicoplasmas&lang=br](http://www.icb.usp.br/bmm/ext/index.php?option=com_content&view=article&catid=12%3Ageral&id=75%3Amicoplasmas&lang=br) (acesso em 05 de setembro de 2014)

### 3.5.2 Epidemiologia e transmissão

A PES tem como variação o seu período de incubação na granja de 10 a 21 dias, sua gravidade e importância econômica na granja está associada a variações climáticas, sistema de produção utilizado e ao manejo (KOBISCH, 2000). Fatores climáticos como temperatura, umidade, volume de ar, ventilação e gases, juntamente com sistemas de produção contínua e falta de higiene, aumentam o risco de ocorrência da enfermidade nas granjas (SCHWARTZ, 2001). A forma clínica da doença é mais comum nos animais em crescimento e terminação, mas em rebanhos sem imunidade, a doença pode afetar leitões já a partir de duas semanas de idade, bem como animais em fase de reprodução (STÄRK, 2000).

Com a introdução da infecção na granja, o período de latência pode variar de quatro a seis semanas, podendo em alguns casos chegar a dois ou três anos. Por outro lado, em granjas infectadas o período de latência é variável, podendo não ocorrer manifestação dos sinais clínicos (SOBESTIANSKY et al., 1994).

A transmissão do *M. hyopneumoniae* entre animais ocorre principalmente através do contato direto com secreções respiratórias e via aerossóis que são dispersos no ambiente em crises de tosse que o animal acometido apresenta e que posteriormente são inalados por um animal susceptível. Ao entrarem em contato direto com suínos infectados, Morris et al. (1995) relataram que suínos saudáveis apresentaram sete vezes mais chances de soroconverterem se comparado com suínos saudáveis que tiveram contato indireto. Uma vez infectado, o animal produz resposta imune contra o agente, porém a bactéria não é completamente eliminada do trato respiratório do animal (SØRENSEN et al., 1997; DESROSIERS, 2001), o que o torna portador assintomático do agente, capaz de manter a infecção no rebanho.

Demonstrando a importância da transmissão do agente via aerossóis, Otake et al. (2010) coletaram amostras de ar de diferentes direções e distâncias a partir de uma granja infectada, totalizando 31 pontos de amostragem. O agente foi detectado em seis pontos de coleta até a distância de 9,2 km do foco, das quais em três amostras o agente encontrava-se viável após inoculação intra-traqueal, induzindo sinais clínicos e lesões pulmonares características da infecção. É também relatada a transmissão de forma indireta através de fômites (BATISTA et al., 2004), porém esta ocorre com menor eficiência possivelmente pela baixa resistência da bactéria fora do hospedeiro.

Animais com mais de 10 meses de idade, que já tenham se infectado com o *M. hyopneumoniae* durante a fase lactente, não excretam mais o agente, pois se tornaram imunes, sendo então animais mais jovens o foco de programas de

erradicação (MAESet al., 2008), como o praticado na Suíça que diminuiu a incidência de casos clínicos a níveis abaixo de 1% (STÄRK et al., 2007).

O aparecimento de problemas respiratórios no rebanho está diretamente relacionado com a introdução de animais susceptíveis, aumentando-se o risco de infecção quanto maior for o grupo de animais introduzidos e maior for o número de fontes fornecedoras de suínos (JORSAL e THOMSEN, 1988), sendo possível controlar surtos através de medidas de biossegurança.

Segundo Sibila et al. (2009), as formas de transmissão dentro de uma granja produtora de suínos variam de acordo com o sistema de criação utilizado (ciclo completo, UPL – unidade produtora de leitões –, creche ou terminação). Isto se deve principalmente pela forma de contato e manutenção do agente no ambiente e práticas de manejo aplicadas na criação. No ciclo completo, normalmente, há infecção entre porcas e leitões e entre suínos mais velhos e jovens. Já nos demais sistemas, por haver apenas uma classe de animais confinada, o status imunitário dos indivíduos tende a ser semelhante, diminuindo então as chances de novos casos.

### 3.5.3 Patogenia

O processo de patogênese desse gênero inclui: adesão, colonização, citotoxicidade, ciliostase, competição por substrato, evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro. Este processo predispõe à colonização por bactérias oportunistas. Ainda, o agente altera a função de macrófagos alveolares, diminuindo a ação fagocítica destes e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (THACKER, 2006).

Há aderência (mediada por proteínas, como a P97), causa lesões aos cílios, descamação celular e favorecimento de infecções secundárias (principalmente por *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*). Além disso, é capaz de interagir de forma peculiar com o sistema imune, causando um efeito mitogênico em linfócitos e levando à grande acúmulo de células inflamatórias no tecido linfóide associado aos brônquios (BALT). Existe também uma forma ainda não bem definida de imunossupressão, que seria um dos determinantes para a associação de agentes bacterianos secundários à infecção primária pelo micoplasma. Recentemente, com o surgimento no Brasil da infecção pelo circovírus, esse quadro ficou ainda mais complexo, pela interação entre vírus/ Mycoplasma/ infecções bacterianas secundárias (BARCELLOS et al., 2007).

Djordjevic et al. (2004) demonstraram que a adesina P97 de *M. hyopneumoniae* é seletivamente clivada após a sua tradução, gerando subprodutos com diferentes tamanhos.

Heterogeneidade entre as cepas de *M. hyopneumoniae* foi observada através de teste de inibição do metabolismo, digestão com enzimas de restrição, PCR, perfil total de proteínas e de glicoproteínas (DESROSIERS, 2001). Vicca et al. (2003) encontraram uma alta variação de virulência nas cepas de *M. hyopneumoniae*. Segundo aqueles autores, as cepas de moderada ou alta virulência apresentaram uma banda de 5000pb, determinada através de Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), que estava ausente nas cepas de baixa virulência.

A caracterização antigênica de cepas de determinados patógenos é essencial para a seleção de antígenos vacinais adequados e deve ser realizada periodicamente, tendo em vista a constante mudança de perfil antigênico das cepas prevalentes (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003).

A base molecular da patogenicidade de alguns micoplasmas sugere que o dano provocado nesses hospedeiros se deve à própria resposta imune e inflamatória, ao invés do efeito tóxico direto causado pelos componentes celulares destes microrganismos (RAZIN et al., 1998). Com o sequenciamento da cepa patogênica 232 de *M. hyopneumoniae*, foram identificados oito genes para proteases, 53 genes para lipoproteínas (8,5% do genoma) e seis genes homólogos a adesina P97 que poderiam contribuir para a persistência e virulência do agente (MINION et al., 2004). Proteases estão ligadas à virulência de bactérias Gram positivas (TORTORA et al., 2012) sendo que uma ou mais delas poderiam estar envolvidas no processamento pós-traducional da adesina P97, que é um fator de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* bem caracterizado (DJORDJEVIC et al., 2004). Lipoproteínas, que são os principais componentes de membrana de micoplasmas, compreendem aproximadamente 2/3 da massa total da membrana e são elas que normalmente sofrem uma variação antigênica frente à resposta imune do hospedeiro (RAZIN et al., 1998). Por outro lado, a função dos genes homólogos à adesina P97 é desconhecida e provavelmente não está relacionada com a adesão, uma vez que, apenas um deles possui o domínio repetitivo R1 responsável pela ligação ao receptor ciliar (MINION et al., 2004). Cepas com baixa capacidade de aderência ao cílio das células epiteliais do trato respiratório suíno não são patogênicas; com exceção da adesina ciliar P97, outros fatores de patogenicidade não têm sido claramente estabelecidos em *M. hyopneumoniae* (ZIELINSKI e ROSS, 1993). A adesina P97, identificada por Zhang et al. (1995), reconhece receptores glicolipídicos sulfatados presentes nos cílios das células epiteliais do trato respiratório suíno. HsueMinion (1998) identificaram o epítipo da P97

que é responsável pela ligação ao receptor ciliar, uma sequência repetitiva de cinco aminoácidos que é altamente imunogênica e que está localizada na porção terminal da proteína. Cepas de *M. hyopneumoniae* com variação no número de repetições da região R1 foram identificadas, sugerindo que esta variação poderia influenciar a capacidade de ligação ao cílio do trato respiratório suíno (WILTON et al., 1998).

Após aderir-se aos cílios da traquéia, brônquios e bronquíolos, *M. hyopneumoniae* inicialmente paralisa e depois destrói estas estruturas, predispondo os suínos às infecções secundárias (DEBEY e ROSS, 1994) e também interage com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide perivascular e peribrônquica características da PES, sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões (RODRIGUEZ et al., 2004). Evidenciou-se que esses microrganismos possuem fatores mitogênicos para linfócitos, os quais seriam responsáveis pela hiperplasia do tecido linfóide peribronquiolar característica da doença. Os micoplasmas são considerados super-antígenos (MIMS et al., 1995), capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T (RAZIN et al., 1998) escapando das defesas naturais do hospedeiro fixando-se firmemente à mucosa respiratória (YAMAMOTO, 1994), podendo sua localização no lúmen explicar a dificuldade de eliminação do agente.

Outros aspectos da patogenia da PES têm sido encontrados. Como foi identificado no *M. hyopneumoniae* uma lipoproteína de superfície imunodominante P65 que é especificamente reconhecida durante a infecção. A P65 pertence à família de enzimas lipolíticas, embora a sua função fisiológica e ou patogênica ainda não tenha sido elucidada, pode desempenhar uma importante função nutricional, sendo responsável pela aquisição de ácidos graxos de cadeia longa e também por reduzir a função de surfactantes pulmonares, favorecendo a atelectasia dos alvéolos (SCHMIDT et al., 2004).

#### **3.5.4. Sinais clínicos e lesões**

As lesões microscópicas variam de acordo com o progresso da doença, como descrito por Sobestiansky et al., (1999) e Thacker (2006). Inicialmente há proliferação linfóide podendo se estender até a camada muscular da submucosa dos bronquíolos para após ocorrer infiltração de linfócitos e monócitos nas regiões próximas aos brônquios, bronquíolos e vasos pulmonares, pequenos acúmulos de neutrófilos no lúmen e ao redor das vias aéreas, leve necrose de epitélio e perda de cílios. A lesão

principal é pneumonia broncointersticial com hiperplasia de BALT (Tecido Linfóide Associado ao Brônquio).

Pode também ocorrer edema nos alvéolos, hiperplasia de pneumócitos tipo 2 e expansão dos septos interalveolares, com posterior estenose das vias aéreas que acarretam na consolidação do pulmão. O infiltrado mucocelular característico é de neutrófilos, células mononucleares nos vasos e ao redor de brônquios e bronquíolos. Em casos crônicos da doença, observa-se hiperplasia linfóide peribronquial, peribronquiolar e perivascular, alvéolos colapsados e enfisema (THACKER, 2006; REDONDO et al., 2009).

Ao visualizar em microscópio eletrônico de varredura pulmões de suínos gnotobióticos infectados com *M. hyopneumoniae*, verificaram que a partir de uma semana pós infecção, diversas áreas da traqueia e brônquios não apresentavam cílios ou estes haviam sido afetados pelo agente que fora encontrado de forma dispersa em pequenos agregados ou em áreas com cílios remanescentes (UNDERDAHL et al., 1980).

Todos os suínos são susceptíveis, mas as fases de recria e terminação são as mais propensas a apresentarem os sinais característicos (SIBILA et al., 2009), já que animais destas fases tem uma baixa concentração de anticorpos contra o agente. Os suínos acometidos apresentam tosse seca, não produtiva e crônica, com o grau dos sinais demonstrados dependente da intensidade da infecção e da presença de patógenos secundários aos quais os suínos estejam submetidos (LEON et al., 2001). O aparecimento dos sinais ocorre aproximadamente 13 dias pós infecção, variando entre um mínimo seis e máximo de 27 dias pós infecção, cessando praticamente dois meses pós infecção (SØRENSEN et al., 1997). Essa tosse crônica resulta em uma pior conversão alimentar e conseqüente redução no ganho de peso diário que acarreta em uma maior desuniformidade entre suínos de um mesmo lote. Outros sintomas possivelmente apresentados como febre, prostração e redução de apetite são decorrentes de infecções secundárias (THACKER, 2006).

Na macroscopia são identificadas lesões pneumônicas na porção crânio-ventral do pulmão, principalmente nos lobos apical, cardíaco, intermediário e diafragmático (DESROSIERS, 2001; DAILIDAVIČIENĖ et al., 2008), caracterizadas por áreas de consolidação pulmonar denominadas de lesões tipo hepatização e coloração variando de púrpura a cinza que, conforme a severidade da infecção tendem a migrar caudalmente (DESROSIERS, 2001). Foi demonstrado que a consolidação pulmonar sugestiva da PES estava presente em 69,4% dos suínos necropsiados de grupos vacinados e não vacinados, com diferentes graus de comprometimento, variando de menos de 25% até mais de 75% da área pulmonar afetada (SIBILA et al., 2009). As

lesões tendem a resolução em aproximadamente 85 dias pós infecção (SØRENSEN et al., 1997), portanto, caso ocorra a infecção dos suínos em uma fase muito precoce de criação, como por exemplo na creche, a maior parte dos animais não apresentará as lesões características no momento do abate.

Normalmente as lesões pulmonares quando causadas somente por micoplasma tendem a ser focais e bem demarcadas, contudo, quando ocorre a presença de agentes secundários estas lesões tendem a se difundir pelas vias aéreas e acumular catarro muco-purulento em brônquios e bronquíolos (THACKER, 2006; SOBESTIANSKY et al., 2007). O quadro é agravado quando ocorrem associações com agentes que levam a formação do chamado Complexo da Doença Respiratória dos Suínos (PRDC, do inglês Porcine Respiratory Disease Complex). Dentre as associações 10 podem ter agentes bacterianos, como por exemplo, com *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, entre outros, ou ainda agentes virais, como o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV), circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) ou vírus da influenza suína (SIBILA et al., 2009).

### 3.5.5. Controle e profilaxia

Para erradicação e controle da PES, assim como outras doenças infecciosas, o método mais eficaz é o despovoamento total seguido de repovoamento com animais livres do patógeno em questão (HARRIS, 2000), porém existem outras maneiras mais econômicas e operacionalmente menos dispendiosas, como o despovoamento parcial, que tem uma eficácia entre 80% e 90% para eliminar o *M. hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (BAEKBO, 2001), sendo amplamente utilizado em todo o mundo.

De acordo com Sobestiansky (1999) em granjas convencionais é praticamente impossível eliminar a infecção por *M. hyopneumoniae* no rebanho, mas pode conviver com a doença reduzindo sua gravidade em níveis economicamente satisfatórios. Multifatoriais são as medidas de controle efetivas, envolvendo fatores de manejo para minimizar a exposição e maximizar a imunidade. Antes de recomendar qualquer uma medida de controle, é importante conhecer a gravidade da doença no rebanho, através do exame de lotes de suínos no frigorífico. Deve ser feito para racionalizar a decisão das medidas a serem tomadas para combater a PES ou as pneumonias em geral, pois muitas vezes a relação custo-benefício das medidas a serem recomendadas não

compensam. Deve-se considerar que essa doença pode ocorrer em diferentes sistemas com variados níveis de prejuízo.

Com o intuito de minimizar os efeitos de exposição, as principais medidas de controle desta enfermidade, são os numerosos fatores de manejo, tais como densidade apropriada do rebanho; ventilação adequada, evitando-se correntes de ar frio sobre os animais, mas permitindo a ventilação constante; fluxo de produção “*all-in, all out*” (todos dentro, todos fora), com realização de vazio sanitário entre lotes no crescimento-terminação; manutenção de boa higiene e desinfecção das instalações; dispor de 1m<sup>2</sup> / suíno na terminação; limitar ao máximo 500 suínos/instalação de terminação; fazer controle efetivo das moscas e proporcionar volume de ar superior a 3m<sup>3</sup> / animal (FLECK e SNELSEN, 2004; SOBESTIANSKY et al., 2001)

Para a PES, as únicas vacinas disponíveis no mercado são as bacterinas. Elas conferem proteção aos suínos, caracterizada esta pela redução das lesões e melhora dos índices de produtividade (ganho de peso e conversão alimentar), porém não impedem a colonização de *M. hyopneumoniae* nem o estabelecimento de suínos portadores, uma vez que este tipo de vacina não estimula uma adequada imunidade de mucosa (IgAs). Apesar disso, reduzem de forma significativa o impacto econômico da PES (MAES et al., 1999; MOREAU et al., 2004). As bacterinas contra a PES apresentam um elevado custo de produção (FAGAN et al., 1997; CHEN et al., 2001) devido às dificuldades no cultivo de *M. hyopneumoniae*.

Uma bacterina que está passando por estudos para *M. hyopneumoniae*, é microencapsulada, administrada por via oral, conferiu proteção efetiva contra a PES. A administração oral de antígenos encapsulados com microesferas evita a degradação no estômago e possibilita a estimulação do sistema imune da mucosa intestinal (Placas de Peyer). Após a estimulação, as células imunocompetentes migram para outros sítios do organismo, como as mucosas respiratória e urogenital e glândulas mamária, lacrimal e salivar. (LIN et al., 2003).

### **3.5.6. Técnicas atuais utilizadas para detecção de mycoplasmas**

Quanto às ferramentas diagnósticas para monitorar os programas de controle e/ou erradicação da doença, os sinais clínicos, sorologia e inspeção de lesões pulmonares no abate são as mais utilizadas. A presença de tosse e lesões pulmonares são ferramentas sugestivas. A sorologia, especificamente o ELISA, é o instrumento diagnóstico mais utilizado para determinar a presença de *M. hyopneumoniae* num rebanho, mas, devido à baixa sensibilidade dos testes de ELISA disponíveis (ERLANDSON et al., 2005), o atraso na resposta imune (THACKER et al., 1998) ou

diferentes interpretações dos resultados sorológicos (SIBILA et al., 2004; SØRENSEN et al., 1997) este tipo de teste não deveria ser usado isoladamente, e outras técnicas diagnósticas mais sensíveis poderiam ser usadas conjuntamente. Por isso se faz necessário desenvolver técnicas mais precisas ou fazer uso combinado das técnicas disponíveis para identificar corretamente o estado da infecção dos rebanhos e, assim, ser possível responder ao crescente interesse na erradicação da *M. hyopneumoniae*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL:

Os procedimentos realizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), registrado sob o número do protocolo CETEA 138/14, aprovado em 17 de dezembro de 2014.

No período de fevereiro a setembro de 2014 foram coletados 55 amostras de pulmão, 38 de fígado, rim e linfonodo, em um frigorífico e um matadouro. O frigorífico está localizado em Ibiúna e o matadouro em Pirassununga, todos no Estado de São Paulo (Quadro 1).

As amostras foram analisadas macroscopicamente no frigorífico. Após a análise, divididas em três partes. A primeira foi fixada em formaldeído à 10% tamponado com carbonato de  $\text{Ca}^{2+}$ , a segunda parte foi congelada à  $-20^{\circ}\text{C}$  e uma terceira parte foi congelada em freezer convencional.

**Quadro 1** - Relação dos frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, locais onde foram realizadas as colheitas dos pulmões.

FRIGORÍFICO OU MATADOURO	LOCAL	DATA DA COLHEITA	NÚMERO DE AMOSTRAS
Frigorífico	Ibiúna	11/06/2014	17
Matadouro	Pirassununga	07/07/2014 e 28/07/2014	38

### 4.2 METODOS:

#### 4.2.1 Análise Macroscópica

Os pulmões de todos os suínos do lote que estavam sendo abatidos foram submetidos a análise macroscópica, no frigorífico ou matadouro: o aspecto que o pulmão apresentava, sua coloração, presença de aderência da pleura na carcaça, presença de edema. Após serem coletados os pulmões de todos os animais, foram armazenados em caixas isotérmicas com gelo reciclado para transporte até o laboratório localizado no Instituto Biológico de São Paulo.

#### 4.2.2 Preparo dos pulmões para exame histológico

As amostras foram processadas no Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura do Instituto Biológico de São Paulo. Realizou-se a histotécnica (desidratação, diafanização, emblocagem em parafina, microtomia e coloração hematoxilina/eosina) segundo Michalany (1990).

Após a fixação das amostras no formaldeído, submetem-se a duas lavagens por imersão no mesmo tampão por um período de 10 minutos. Seguiu-se desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 70% ao álcool absoluto. Logo após a desidratação - o material foi emergido em banhos de xilol para a diafanização durante 1h em cada. Manteve-se, após esse procedimento, os cassetes em um *Becker* contendo parafina histológica derretida e deixados embebidos *overnight* em estufa a 52°C. Em seguida, foram incluídas em parafina em moldes plásticos apropriados (Quadro 2). Obteve-se os cortes de 4 µm de espessura com auxílio de micrótomo HYRAX M 55Zeiss®.

A realização deste protocolo foi feita manualmente com duração média de 8h.

**Quadro 2** - Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina

REAGENTES	TEMPO
Álcool 70%	1h
Álcool 80%	1h
Álcool 95% I	0,5h
Álcool 95% II	0,5h
Álcool Absoluto I	1h
Álcool Absoluto II	1h
Xilol I	1h
Xilol II	1h
Xilol III	1h
Parafina	<i>overnight</i>
Após, emblocar nos moldes com parafina em temperatura de 52°C	

#### 4.2.3 Preparo das lâminas histológicas para coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E)

Os cortes foram estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com gelatina ultrapura, facilitando a adesão do corte histológico na lâmina. Em seguida, colocou-se a lâmina em estufa 52°C *overnight* e procedeu-se a desparafinização (xilol), lavagem em álcool absoluto, hidratação em soluções hidro alcoólicas, coloração pela H&E, desidratação em álcoois e diafanização em xilol modificado segundo Michalany (1990) (Quadro 3). Para a montagem da lâmina e lamínula, empregou-se a resina sintética Entellan (Merck®).

**Quadro 3** - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes de tecido, modificado segundo Michalany (1990).

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	3 minutos
Diferenciador de Hematoxilina	Imergir rapidamente
Eosina	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

#### **4.2.4 Preparo do material para a Imunoistoquímica (IHQ):**

O anticorpo monoclonal para realização desta técnica foi gentilmente cedido pela Dra. Suzana Satomi Kuchiishi, Médica Veterinária, Responsável Técnica Bacteriologia e Gerente Técnica e da Qualidade Substituta do Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal-CEDISA, Concórdia/ SC.

Para a IHQ, o método foi inicialmente semelhante ao de rotina, os cortes foram colocados em lâminas silanizadas. Após a desparafinização utilizou-se kit LSAB+System-HRP K0690 (DAKO) e a reação antígeno-anticorpo foi revelada com o cromógeno DAB+Substrate K3468 segundo protocolo do fabricante.

##### **4.2.4.1 Protocolo para realização da imunoistoquímica utilizando o kit da Dako**

#### **1. Desparafinização e hidratação dos tecidos, secar os cortes com papel filtro**

#### **2. Digestão enzimática**

- Proteinase k (Dako-S3020)
- Incubar 5 minutos em temperatura ambiente
- Lavar bem com água destilada

#### **3. Bloqueio da peroxidase endógena**

- Água oxigenada 3% (10 volumes)
- Banho de 20 minutos em temperatura ambiente
- Lavar em água destilada e banho em tampão PBS por 5 minutos
- Secar bem os cortes

#### **4. Anticorpo primário**

- Anticorpo monoclonal diluído em diluente Dako-S3022
- Incubar em câmara úmida *overnight*
- Lavar com tampão PBS, 2 banhos de 1 minuto cada
- Secar bem os cortes

### **5. Sistema de visualização**

- LSAB + HRP Kit Dako-K0690
- Incubar cada reagente por 20 minutos
- Lavar com tampão PBS: 2 banhos de 1 minuto cada entre os reagentes do kit e depois do segundo reagente.

### **6. Segundo sistema de visualização**

- *Liquid DAB* + Dako-K3468
- Secar os cortes e colocar 1 ml do Dako-3468 + 20 µL do DAB
- Incubar por 5 minutos
- Lavar em água corrente e destilada

### **7. Contra coloração**

- Hematoxilina de Harris
- 3 minutos
- Desidratar e fazer montagem das lâminas para visualização em microscópio óptico.

#### **4.2.5 Preparo do material para a Hibridização *in situ*:**

Os pares de primers utilizados para essa técnica foram adquiridos da *Life Technologies Brazil* e o Kit comercial de Hibridização *in situ* da Dako K0620 – *GenPoint*. Foram processadas 35 amostras.

Para a Hibridização *in situ*, o método foi inicialmente semelhante ao de rotina os cortes foram colocados em lâminas silanizadas. Após a desparafinação utilizou-se kit GenPoint K0620 (DAKO). As sequências dos primers utilizadas para essa reação foram: *forward* 5'-Biotin-GTC TAT CAA AAT TGC CAA TC -3' e o reverso 5'-Biotin-TCC CAT AAC CTT GTC TTC AG-3', dos nucleotídeos 851-870 e 1351-1370 respectivamente. Os primers são marcados com biotina para visualização com o cromógeno. (KWON et al., 2002).

##### **4.2.5.1 Protocolo para realização da hibridização *in situ* utilizando o kit da Dako**

- 1. Desparafinação e hidratação dos tecidos, secar os cortes com papel filtro**

**2. Recuperação antigênica**

- Aquecer banho-maria à 96°C
- Tampão de recuperação antigênica DAKO S1699: diluir o tampão que está 10x concentrado em água destilada (1:100)
- Colocar as laminas por 40 minutos dentro da cuba com tampão no banho maria.
- Deixar as laminas na cuba esfriando em temperatura ambiente por 20 minutos.

**3. Proteinase K**

- Pingar sobre o corte e deixar por 5 minutos
- Lavar 2 vezes em água destilada

**4. Bloqueio de Peroxidase endógena**

- Peróxido de hidrogênio 3% (10V) a 0,3% em metanol
- Incubar por imersão por 20 minutos em temperatura ambiente.
- Lavar 2 vezes em água destilada

**5. Programar o Hibridizador para a desnaturação e hibridização**

- Desnaturação = 92°C
- Hibridização = 37°C (Overnight)
- Inserir as tiras de umidade no aparelho molhando-as em água destilada

**6. Aplicação das sondas**

- Com os cortes secos colocar uma gota dos primers diluídos 1:100 em Solução de Hibridização diluída 1:1 em água ultra pura e cobri-los com uma lamínula de vidro
- Colocar no hibridizador já programado

**7. Retirar as laminas do hibridizador e lavar por imersão em tampão LBST para retirar as lamínulas.****8. Estabilizar o Kit GenPoint Tiramidine DAKO K0620 em temperatura ambiente****9. Aquecer o banho-maria à 48°C****10. Banho de estringência**

- Solução de estringência (50x concentrada) diluir 1:50 em água destilada

- Colocar a solução na cuba no banho-maria e quando atingir 48°C colocar as laminas e deixar por 30 minutos

**11. Lavar por imersão em tampão LBST 2 vezes de 5 minutos cada**

**12. Estreptavidina primaria**

- Diluir 1:100 em tampão diluente que está no kit (preparar 30 minutos antes da aplicação)

- Aplicar nos cortes secos e deixar por 30 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida

**13. Lavar por imersão em tampão LBST 2 vezes de 5 minutos cada**

**14. Biotinil Tiramida**

- Aplicar nos cortes por 15 minutos em temperatura ambiente

**15. Lavar por imersão em tampão LBST 2 vezes de 5 minutos cada**

**16. Estreptavidina secundária**

- Aplicar nos cortes por 15 minutos em temperatura ambiente

**17. Sistema de visualização**

- *Liquid* DAB + Dako-K3468

- Secar os cortes e colocar 1 ml do Dako-3468 + 20 µL do DAB

- Incubar por 5 minutos

- Lavar várias vezes em água destilada

**18. Contra coloração**

- Hematoxilina de Harris por 5 minutos

- Desidratar e fazer montagem das lâminas para visualização em microscópio óptico.

**4.3. Análise Microscópica**

Realizou-se a leitura das alterações pulmonares em microscópio Carl-Zeiss Axio Scope.A1® baseando-se na morfologia do parênquima pulmonar, brônquios/bronquíolos, vasos sanguíneos, BALT e pleura.

#### **4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

##### **4.4.1 Técnica de Contrastação Negativa**

Todas as 55 amostras foram processadas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de SP.

Nesta técnica as amostras de pulmões foram descongeladas e maceradas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e essa suspensão são colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filtro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2% e pH 5,0 sendo observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208 para a visualização do agente (BRENNER e HORNE, 1959; HAYAT e MILLER, 1990).

##### **4.4.2 Técnica de Imunocitoquímica Eletrônica (Imunomarcação com partículas de ouro coloidal em contrastação negativa)**

Todas as 55 amostras foram processadas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de SP.

Nesta técnica desenvolvida por KNUTTON (1995), as amostras de pulmões foram descongeladas e maceradas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e essa suspensão são colocadas em contato com grades metálicas. Após, o excesso é removido com papel filtro e as mesmas, são depositadas sobre gotas de anticorpo monoclonal específico para a *Mycoplasma hyopneumoniae*, diluído na proporção de 1:100 durante 30 minutos. Após lavagens sucessivas em gotas de PBS, as telas são incubadas em gotas de proteína A conjugada com ouro de 10 nm, diluído a 1:20 em PBS a 0,5% durante 30 minutos. As telas foram então contrastadas com gotas de molibdato de amônio a 2% e pH 5,0. Como resultado a reação antígeno-anticorpo será realçada pelas partículas de ouro coloidal que marcarão o antígeno.

#### **4.5. REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE (PCR)**

Realizou-se a PCR, no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de SP, para a identificação do agente da PES, em 3 amostras previamente positivas pela técnica de contrastação negativa e imunocitoquímica.

Dentre essas amostras, utilizou-se 7 de pulmões congelados positivos e um controle negativo para a realização da extração de DNA pelo kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Anexo 2). Após a extração submeteu-se as amostras a eletroforese em gel de agarose para a visualização do DNA extraído. Concluído esse procedimento foi feita a reação da PCR (Quadro 4).

As sequências dos primers utilizadas para essa reação foram: *forward* 5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3' e o reverso 5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3', do gene 16S do rRNA (MATTSSON et al., 1995).

**Quadro 4:** Protocolo reação PCR

REAGENTES	QUANTIDADE	TEMPO NA REAÇÃO
DNA	1 µl	94°C por 2 minutos
MH-F	4 µl	94°C por 10 segundos
MH-R	4 µl	60°C por 30 segundos
Tampão 5x	40 µl	72°C por 45 segundos
dnTPs	4 µl	72°C por 4 minutos
Taq polimerase	0,8 µl	12°C ∞
H <sub>2</sub> O	143,2 µl	

## 5. RESULTADOS

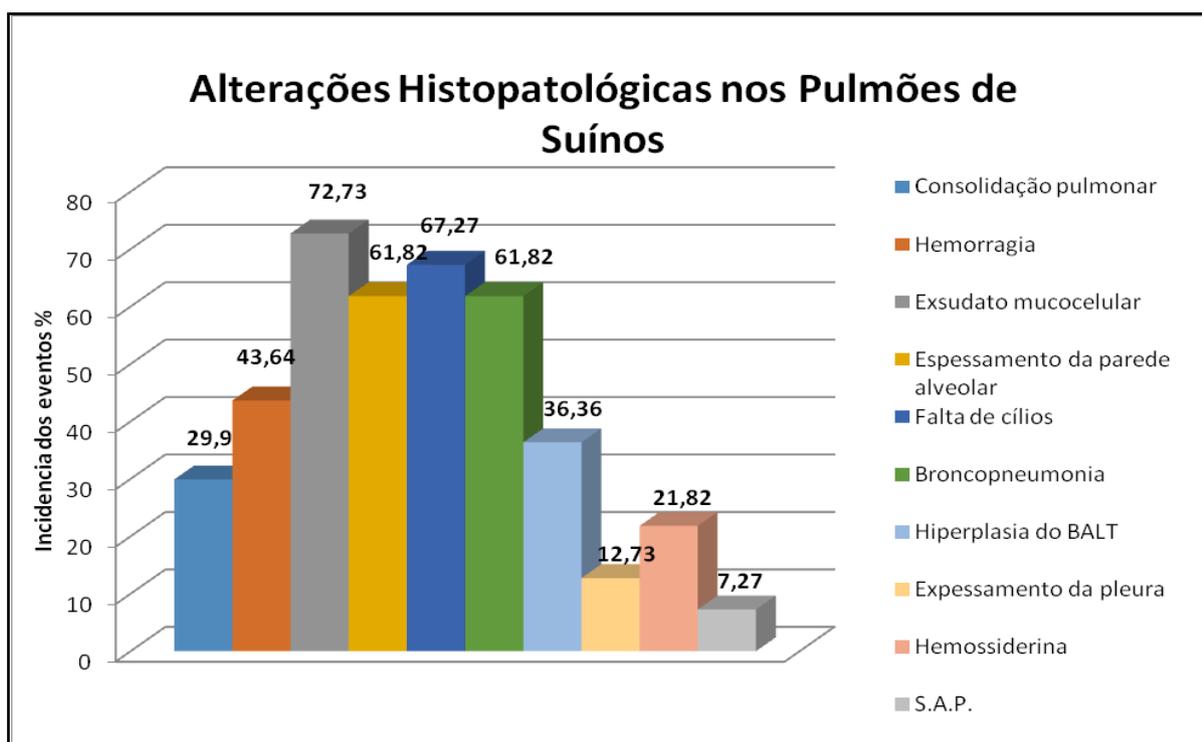
### 5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICAS

Na análise macroscópica realizada no momento da coleta do material observou-se aderência da pleura na costela de 3 amostras.

Todos os pulmões apresentaram-se com hepatização e coloração variando de púrpura a cinza (marmorizados) e com secreções catarrais, esbranquiçadas e purulentas. Em 5 amostras sentia-se a presença de nódulos subpleurais.

### 5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

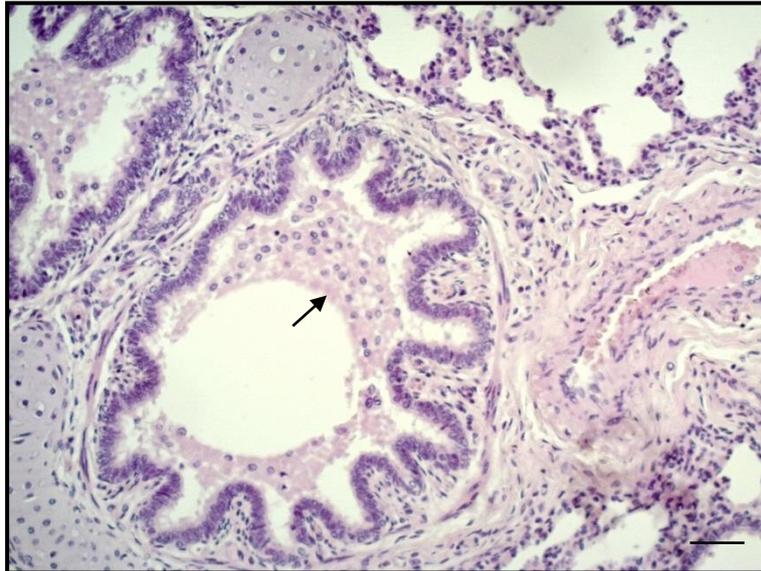
Foram processadas 55 amostras coletadas para a análise histopatológica. (Figura 2), 7,27% das amostras não apresentaram alterações patológicas (S.A.P.).



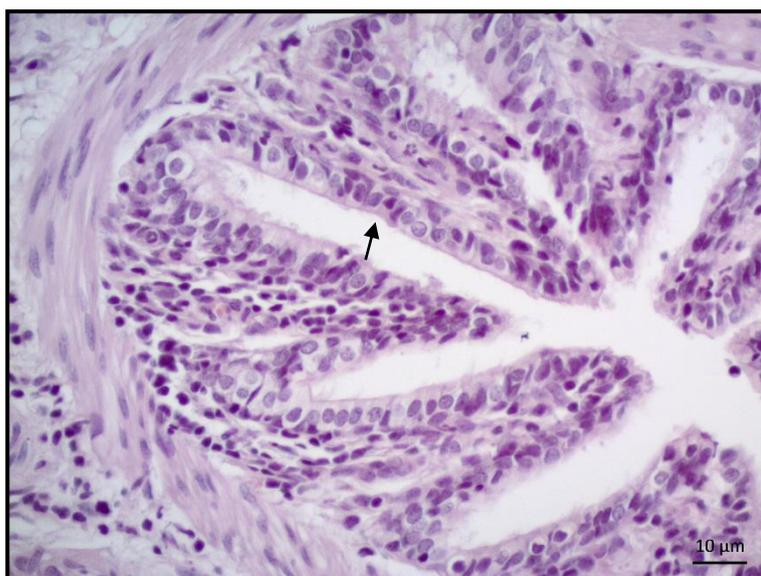
**Figura 2** - Gráfico mostrando a frequência das alterações histopatológicas.

➤ **Brônquio/ bronquíolos**

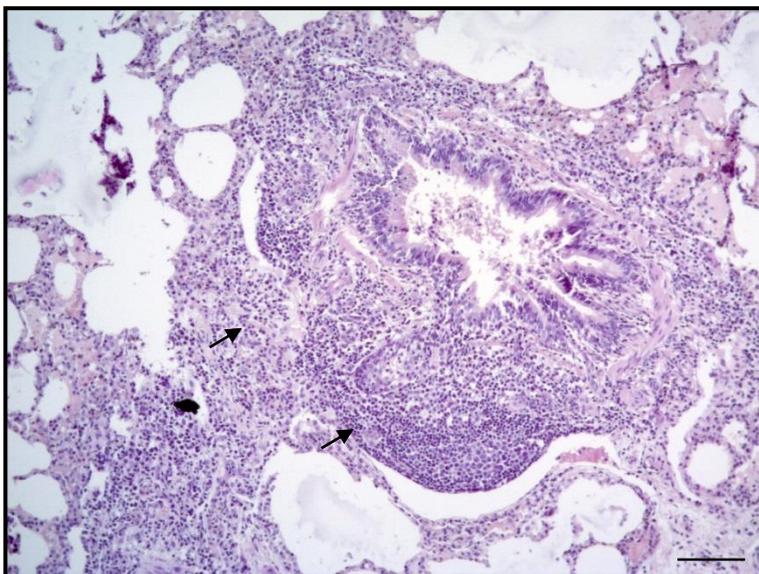
Notou-se a presença de exsudato mucocelular (Figura 3), falta de cílios (Figura 4) e broncopneumonia mono e polinuclear (Figura 5).



**Figura 3** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina com presença de exsudato mucocelular no interior dos brônquios (seta preta) (barra 20 $\mu$ m).



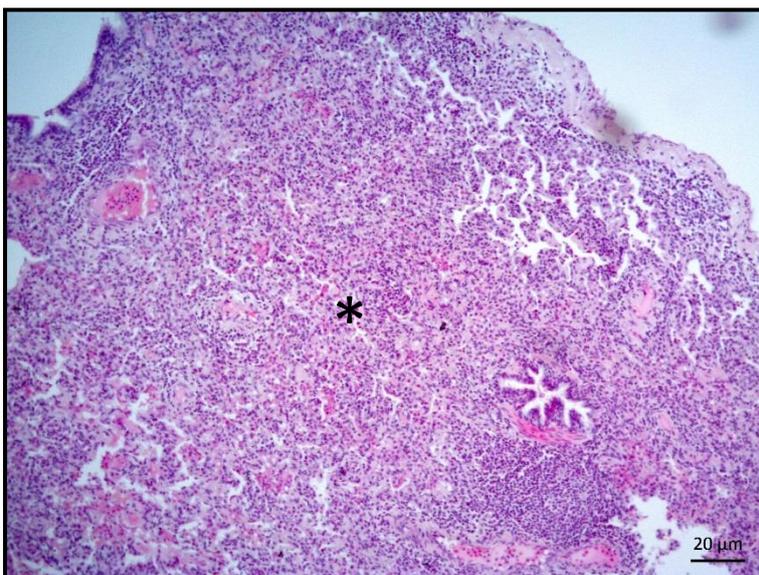
**Figura 4** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo falta de cílios nas células epiteliais do bronquíolo (seta preta).



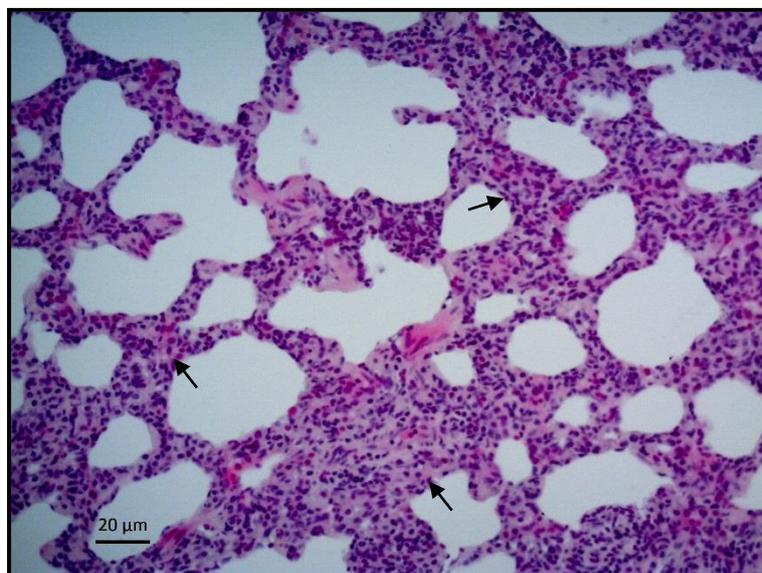
**Figura 5** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, mostrando uma broncopneumonia intersticial (setas pretas) (barra 100  $\mu\text{m}$ ).

➤ **Alvéolos (parênquima pulmonar)**

Nos alvéolos encontrou-se grandes áreas com consolidação pulmonar (Figura 6) e o espessamento da parede alveolar (Figura 7).



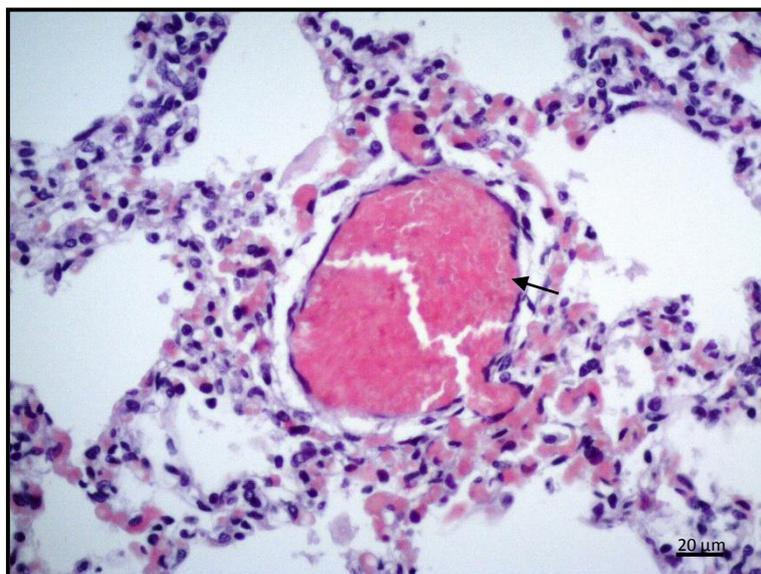
**Figura 6** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando consolidação pulmonar (asterisco).



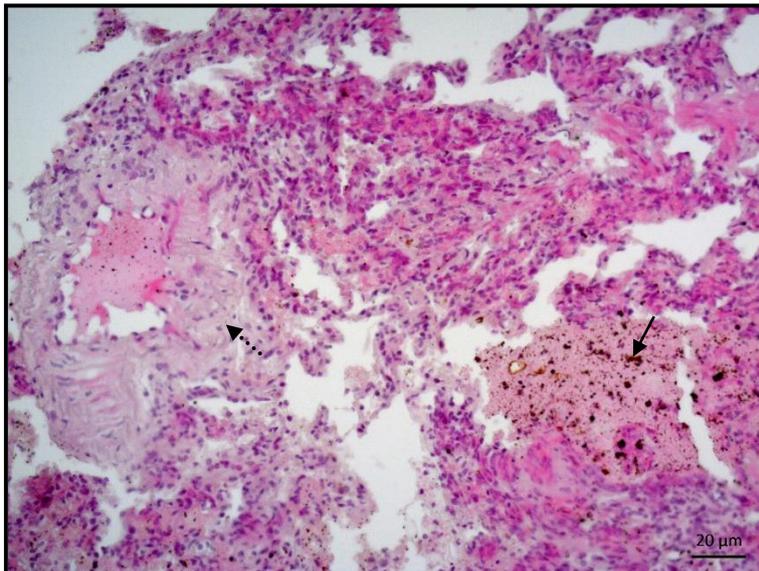
**Figura 7** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, com espessamento da parede alveolar (setas pretas).

### ➤ Vasos

Encontrou-se vasos sanguíneos congestionados (Figura 8), vasos arteriosclerosados, presença de hemorragia em 24 amostras e em 12 dessas notou-se a presença de hemossiderina (Figura 9).



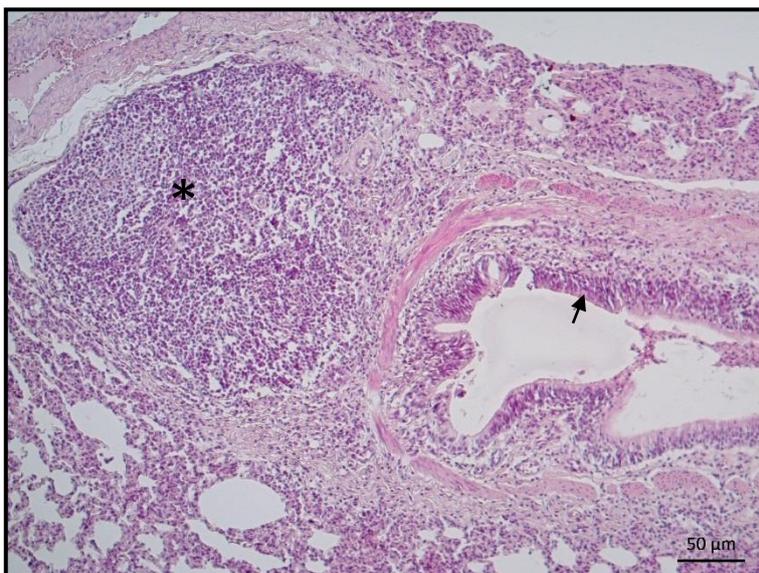
**Figura 8** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo vaso congestionado (seta preta).



**Figura 9** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, exibindo hemorragia com presença de hemossiderina (seta preta contínua) e vaso arteriosclerosado (seta preta descontinua).

➤ **BALT (Tecido linfoide associado ao brônquio)**

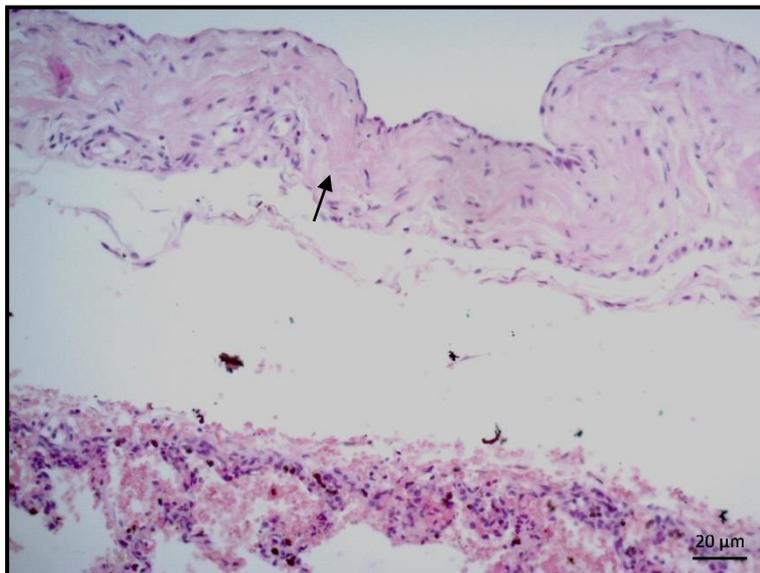
Ocorreram em 20 amostras das 55 analisadas a hiperplasia do BALT (Figura 10).



**Figura 10** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando hiperplasia do BALT (asterisco) e achatamento das vilosidades do brônquio (seta preta).

### ➤ Pleura

Visualizou-se em 7 amostras de 55 analisadas o espessamento da pleura (Figura 11).



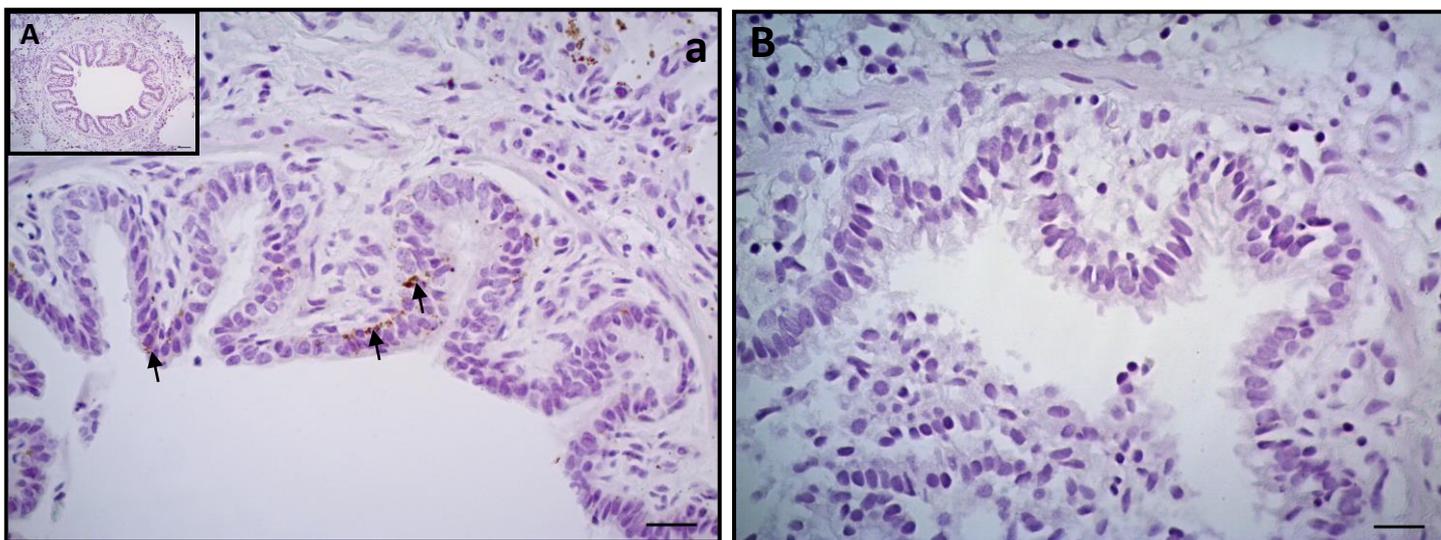
**Figura 11** – Fotomicrografia de corte histológico de pulmão suíno corada pela técnica de Hematoxilina e Eosina, apresentando espessamento da pleura. (seta preta)

### 5.3. Imunoistoquímica para detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae*

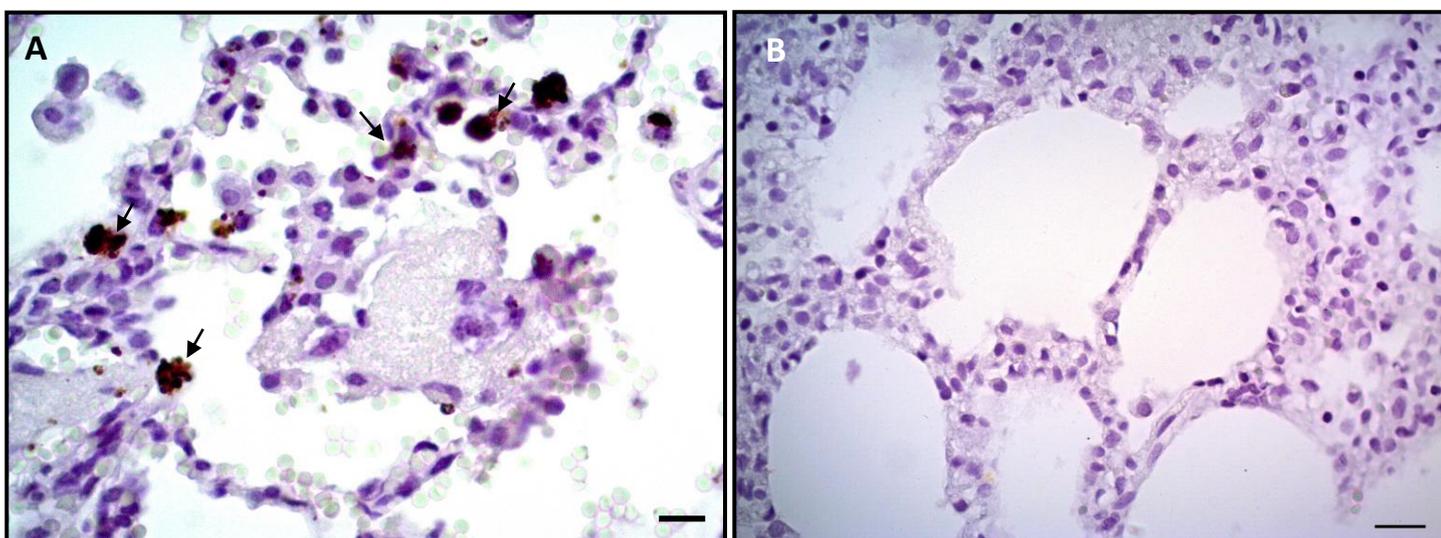
Pela técnica de Imunoistoquímica obteve-se o resultado positivo em 41 (74,55%) das 55 amostras coletadas. A marcação antígeno-anticorpo pode ser visualizada tanto no epitélio brônquico, tanto no epitélio alveolar (Figuras 12, 13 e 14).

Comparando a positividade das amostras com os achados na histopatologia visualiza-se a presença de exsudato mucocelular em 80,48% (33/41), espessamento da parede alveolar em 63,41% (26/41), falta de cílios em 68,29% (28/41), broncopneumonia intersticial em 65,85% (27/41), hiperplasia do BALT em 39,02% (16/41), hemorragia em 56,09% (23/41), consolidação pulmonar em 34,14% (14/41) e mesmo ocorrendo a positividade na imunoistoquímica não foi observado alterações histopatológicas (SAP) em dois fragmentos 4,78% pulmonares.

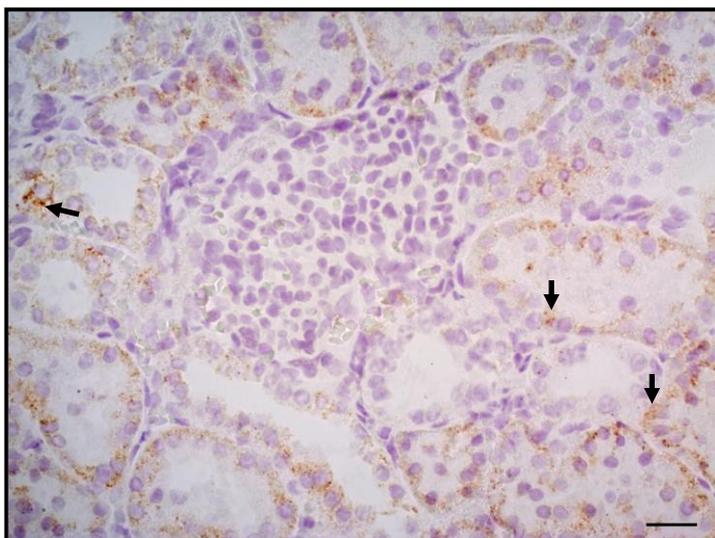
Obteve-se imunomarcação também no rim 43,63% (24/55) (Figura 15), fígado 36,36% (20/55) (Figura 16), linfonodo 40% (22/55) (Figura 17), e em 18,18% (10/55) houve a imunomarcação em hemácias (Figura 18).



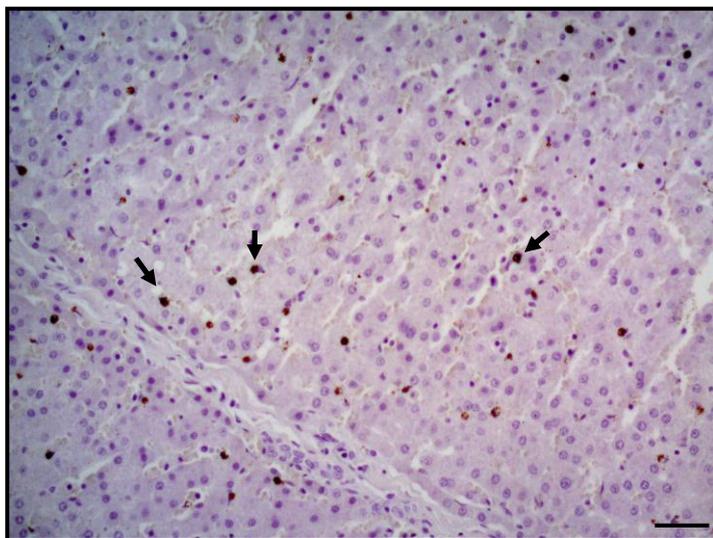
**Figura 12** – A fotomicrografia **A** é de menor aumento de bronquíolo de pulmão de suíno (10x, barra 100  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **a**, é a ampliação de uma região da fotomicrografia **A**, exibindo a positividade da imunomarcção nas células epiteliais do bronquíolo (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunohistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).



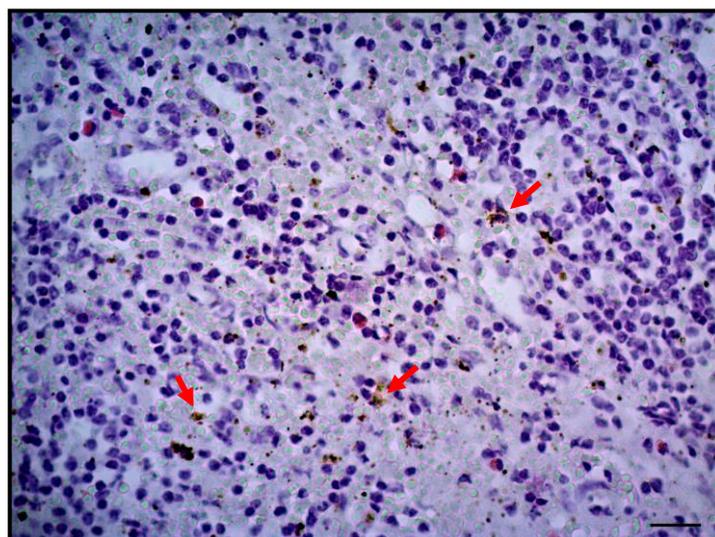
**Figura 13** – A fotomicrografia **A** é de um alvéolo pulmonar de suíno apresentando positividade da imunomarcção nas células da parede alveolar (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunohistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).



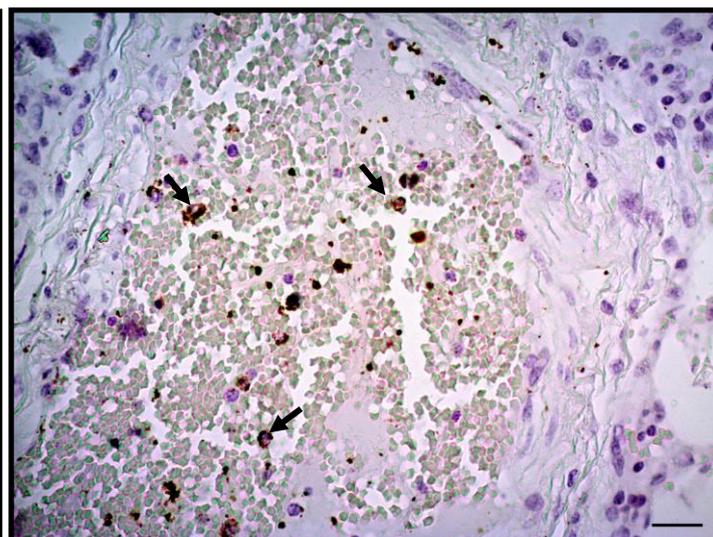
**Figura 14** - Fotomicrografia de um rim de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcagem no túbulo contorcido (setas pretas) (barra 50  $\mu$ m).



**Figura 15** - Fotomicrografia de um fígado de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcagem nos hepatócitos (setas pretas) (barra 50  $\mu$ m).



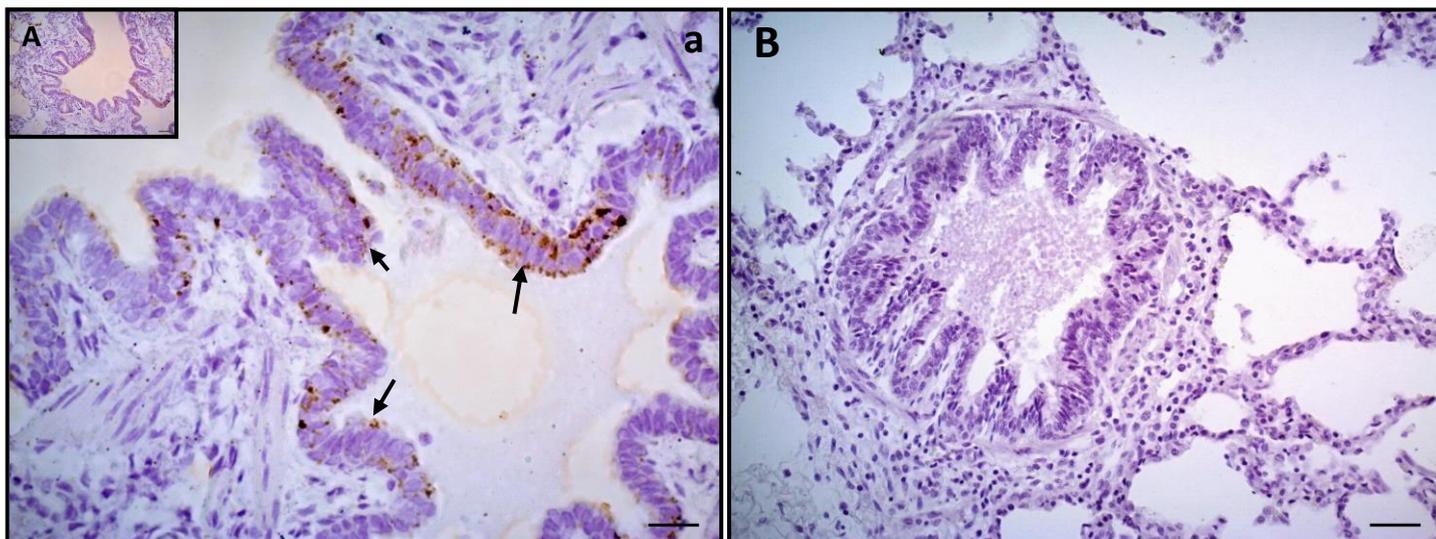
**Figura 16** - Fotomicrografia de um linfonodo traqueobronquial superior esquerdo de suíno apresentando positividade para *M. hyopneumoniae* com imunomarcagem (setas vermelhas) (barra 10  $\mu$ m).



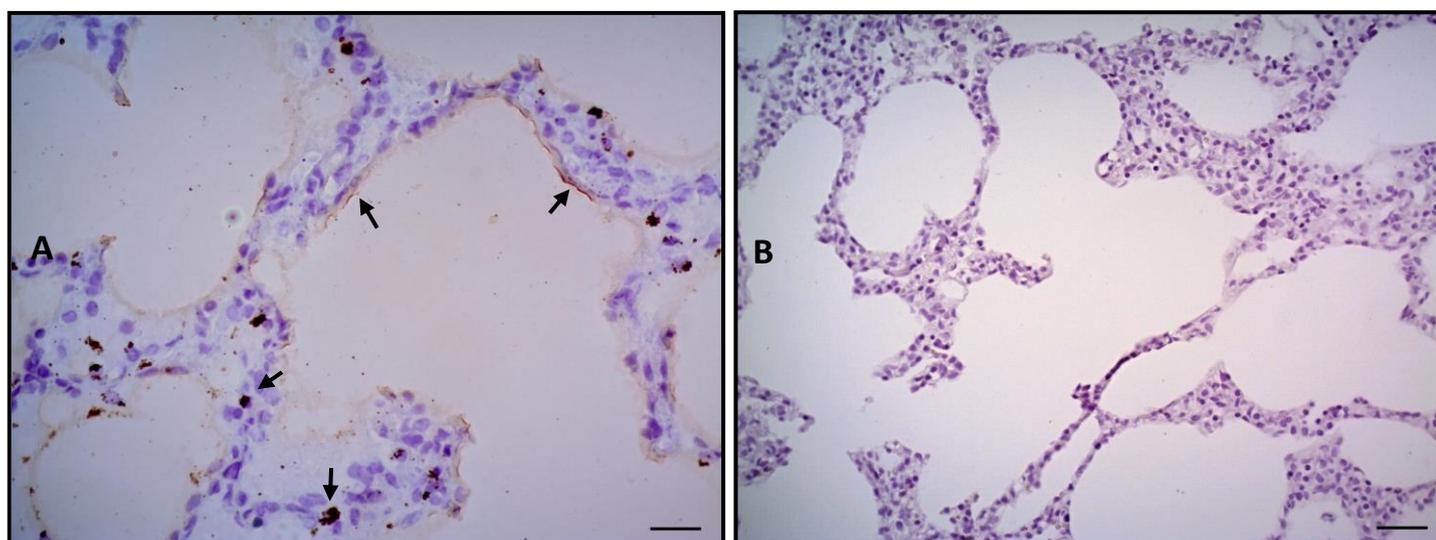
**Figura 17** - Fotomicrografia de uma artéria esclerosada do pulmão de suíno apresentando positividade com imunomarcagem nas hemácias (setas pretas) (barra 10  $\mu$ m).

#### 5.4. HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

Das 35 amostras processadas pela técnica obteve-se o resultado positivo em 26 cortes histológicos, com marcações do genoma bacteriano nos brônquios, bronquíolos e epitélio dos alvéolos. (Figura 18 e 19).



**Figura 18** – A fotomicrografia **A** é de menor aumento de bronquíolo de pulmão de suíno (10x, barra 100  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **a**, é a ampliação de uma região da fotomicrografia **A**, exibindo a positividade, na marcação por meio da técnica de hibridização *in situ* nas células epiteliais do bronquíolo (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de imunistoquímica, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 19** – A fotomicrografia **A** é de um alvéolo pulmonar de suíno apresentando marcação por meio da técnica de hibridização *in situ* nas células da parede alveolar (setas pretas) (barra 10  $\mu\text{m}$ ). A fotomicrografia **B**, é o controle negativo da técnica de hibridização *in situ*, (barra 10  $\mu\text{m}$ ).

## 5.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

### 5.5.1. Contrastação negativa

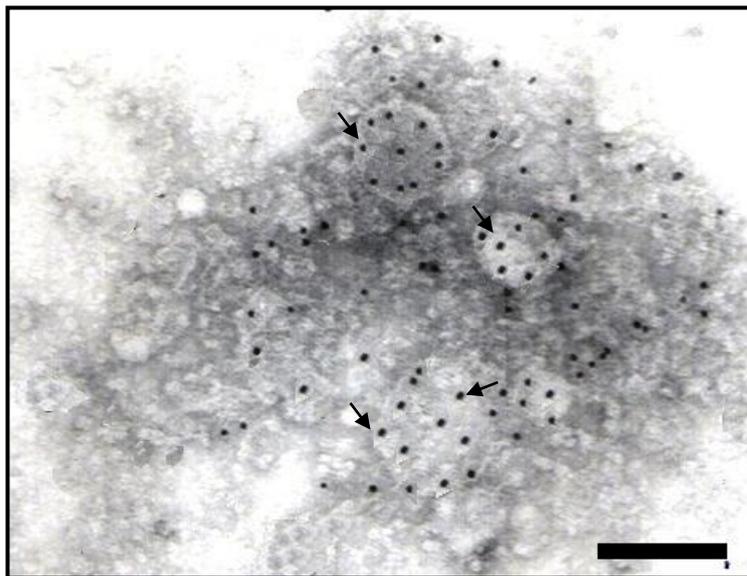
Das 55 amostras visualizadas pelo microscópio eletrônico de transmissão em 34 observou-se partículas pleomórfica de micoplasma. (Figura 20).



**Figura 20** – Fotomicrografia do *Mycoplasma* pela técnica de contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão. Barra de 340 nm (setas pretas). **Fonte:** Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão Instituto Biológico SP.

### 5.5.2 Técnica de Imunocitoquímica Eletrônica (Imunomarcção com partículas de ouro coloidal em contrastação negativa)

Observou-se em 34 amostras das 55 processadas o resultado positivo na imunomarcção com ouro coloidal (Figura 21).



**Figura 21** – Fotomicrografia da marcação do *Mycoplasma* pela técnica de Imunocitoquímica com ouro coloidal na contrastação negativa em Microscópio eletrônico de transmissão. Barra de 140 nm (setas pretas).  
**Fonte:** Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão Instituto Biológico SP.

## 5.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras de pulmão testadas foram negativas para *Mycoplasma hyopneumoniae* na reação de PCR.

## 5.7. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS ENTRE AS TÉCNICAS UTILIZADAS

Ocorreu uma homogeneidade e uma heterogeneidade entre os resultados obtidos pelas técnicas utilizadas no presente trabalho (Quadro 5).

**Quadro 5** – Comparação dos resultados entre as técnicas

<b>CONTRASTAÇÃO NEGATIVA</b>	<b>IMUNOISTOQUIMICA</b>	<b>HIBRIDIZAÇÃO IN SITU</b>	<b>IMUNOMARCAÇÃO OURO COLOIDAL</b>	<b>%</b>
+	+	+	+	54,28
-	-	-	-	17,14
-	+	+	-	17,14
+	+	-	+	5,71
+	-	+	+	2,85
+	-	-	-	2,85

## 6. DISCUSSÃO

Sabendo que o Brasil ocupa o 4º lugar no ranking mundial de exportação de carne suína, sendo esta a mais consumida em todo o mundo, observamos um grande potencial econômico no país. Porém, os suínos são muito susceptíveis a enfermidades infecciosas no Sistema Respiratório. Tais doenças são mundialmente classificadas como o Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC, *Porcine Respiratory Disease Complex*).

O principal agente do PRDC é o *Mycoplasma hyopneumoniae* (LI et al., 2015), uma bactéria fastidiosa, de 0,2 a 2 µm de tamanho, que apresenta uma estrutura celular morfológicamente simples: nucleotídeos, ribossomos, membrana citoplasmática (cerca de 10 nm de espessura) e ausência parede celular (DEMINA et al., 2009; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012).

Pela ausência de parede celular e seu diminuto tamanho, os métodos convencionais, impossibilitam a sua visualização em esfregaços e corte histológico (MICHALANY, 1992; SOUZA, et al., 2007 e WALKER, 2003). Em nosso trabalho, utilizamos a MET, pois, de acordo com Souza, et al (2007) e Walker (2008) é a única técnica que possibilita a sua visualização. Os *M. hyopneumoniae* encontrados nos nossos resultados apresentam as seguintes características: bordas lisas e claras, partes centrais acinzentadas, menos homogêneas e pleomórfica, corroborando com as características descritas por SOUZA, et al. (2007).

A principal enfermidade causada pelo *M. hyopneumoniae* é a Pneumonia Enzoótica Suína (PES), que tem como importância a sua alta morbidade, devido à redução da conversão alimentar que diminui o ganho de peso médio diário (CONCEIÇÃO e DELLAGOSTIN, 2006). Segundo Sobestiansky et al., (1999) e Thacker (2006) as lesões pulmonares microscópicas variam de acordo com o progresso da doença, sendo que a lesão principal observada é uma pneumonia broncointersticial com hiperplasia do BALT. No presente estudo, observou-se que 61,82% (34 animais) apresentaram broncopneumonia intersticial e 36,36% (20 animais) apresentaram hiperplasia do BALT, corroborando com achados clássicos da doença descrita acima.

Além disso, nossas amostras pulmonares exibiram exsudato mucocelular com neutrófilos 72,73% (40 animais), consolidação pulmonar em 67,27% (37 animais) e espessamento e hiperplasia das paredes alveolares com infiltrado inflamatório em 61,82% (34 animais). Apesar de não serem as características clássicas da infecção

por *M. hyopneumoniae*, Redondo et al., (2009) e Hillen et al., (2014) também descrevem esses achados na discriminação da doença. Do mesmo modo, é visto que em 67,27% (37 animais) apresentaram falta de cílios nos brônquios e bronquíolos, característica infecciosa vista por Posá et al., (2013), o que nos leva a crer, que a infecção por *M. hyopneumoniae*, é extremamente complexa com características clássicas e secundárias relevantes no diagnóstico clínico.

A dificuldade de se achar um padrão ouro para o diagnóstico do *M. hyopneumoniae* pode ser dada pelas variações genômicas e ou dos epítomos conhecido do agente, que podem interferir no diagnóstico por ELISA que hoje é o instrumento diagnóstico mais utilizado para determinar a presença de *M. hyopneumoniae* num rebanho. Porém os kits hoje possuem baixa sensibilidade (ERLANDSON et al., 2005) devido a ocorrência de reações cruzadas com *Mycoplasma flocculare* ou *Mycoplasma hyorhinis* possuindo limitações quanto a sua utilização (ROSS e STEMKE, 1995). Apesar de que, essas ligações cruzadas não alterem na profilaxia. A diferença entre os micoplasmas resultam ou não na PES, sendo assim a identificação do agente é de suma importância para o controle da mesma, resultando numa possível diminuição da perda da produção da suínocultura do Brasil.

Assim sendo, infere-se que para ter uma correlação das lesões clássicas do agente com a identificação do mesmo foi necessário fundamentar o presente estudo em três pilares: a MET (contrastação negativa e imunomarcação com ouro coloidal) para a visualização do agente; a Imunoistoquímica para a marcação do epítomo de membrana e a Hibridização *in situ* para a marcação do genoma.

Nas amostras processadas e analisadas pelas técnicas mencionadas, observa-se uma homogeneidade e uma heterogeneidade nos resultados. As que apresentaram todos resultados positivos, que seriam os ideais, foram de 54,28% (19/35) com a visualização do agente, marcação do epítomo e do genoma. Comparando com a histologia, as amostras apresentaram em 78,94% a presença de exsudato mucocelular com neutrófilos, 87,50%, espessamento da parede alveolar e broncopneumonia intersticial em 68,42%, falta de cílios em 63,15%, hemorragia em 47,36%, 42,10 % com hiperplasia do BALT, presença de hemossiderina em 36,84% e 15,78% com consolidação pulmonar.

Nos resultados heterogêneos, obteve-se em 17,14% ausência de visualização do agente pelas técnicas da MET, em 5,71% marcação negativa do genoma, em 2,85% visualização do agente pela MET e a marcação do genoma e marcação negativa do epítomo na imunoistoquímica e em 2,85% houve apenas a visualização na técnica de contrastação negativa.

Acredita-se que os resultados negativos na MET, seja devidos a pequena quantidade de amostras de pulmão empregada podendo este fragmento não conter a bactéria estudada. Já para a não marcação do epítipo sugere-se que possa ser devido a cronicidade dos animais afetados pelo *M. hyopneumoniae* exibindo pequena concentração de microrganismos (DOSTER e LIN, 1988), o que poderia justificar a ausência da imunomarcação em algumas amostras de pulmão. Além do mais, os micoplasmas apresentam uma habilidade particular que é a variabilidade genômica que lhes permitem gerar antígenos de superfície altamente distintos (BAILAO et al., 2007 e BUCHENAU et al., 2010), ou então baseado nas descrições de Souza, (2007), a fixação por formalina a 10% alteraria a morfologia das estruturas dos epítomos impossibilitando a reação.

No presente estudo não houve marcação de 5,71% na Hibridização *in situ* e não obteve-se a sequência no PCR Real Time, situação que nos remete à alta variabilidade genômica do agente. Como mostra no estudo de Santos et al., (2015) que mostra pelo método *Multiple locus variable number tandem repeat analysis* (MLVA) que a genômica de *M. hyopneumoniae* no Brasil é altamente variável, que sugestivamente seja devido a alta temperatura como visto por Walker (1999). Apesar de o genoma ter regiões conservadas (ROCHA E BLANCHARD, 2002) as mutações ao longo dos anos foi um fator de evolução e essa mutação gênica pode ser um fator de adaptação (DORDET-FRISONI, et al., 2014), o que justificaria a não marcação do genoma pelos primers utilizados no estudo tanto na Hibridização *in situ* quanto na PCR.

Além desses achados, no presente estudo observou-se imunomarcações positivas pela técnica de Imunoistoquímica em 22 linfonodos. Sendo que 19 também apresentaram imunomarcação positiva no rim e fígado.

A partir desses achados observou-se que a infecção causada pelo *M. hyopneumoniae* no Brasil e no Estado de São Paulo pode ser considerada uma doença extrapulmonar, uma vez que Antunes (1992) mostra que a forma extrapulmonar apresenta dois mecanismos: "disseminação linfo hematológica, ou ruptura de uma lesão pulmonar".

Também foi observado nas amostras a marcação positiva na imunoistoquímica e na hibridização *in situ* em hemácias. De acordo com SOKOLI et al., (2013) e TOLEDO, (2015), observaram que *Mycoplasma suis*, apresenta tropismo por hemácias de suínos, além disso WEINGART et al., (2015) também relata esse tropismo em felinos. Baseado nesses achados, sugere-se que o *M. hyopneumoniae*,

também pode apresentar um tropismo para as hemácias sendo então um achado novo na doença infecciosa.

Pressupõe-se, que a doença em 6 animais estava na fase inicial, uma vez que os mesmos não apresentaram alterações patológicas - SAP, porém houve marcações positivas pelo método de imunistoquímica.

## 7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se indicar a presença do *M. hyopneumoniae* no Estado de São Paulo.

O melhor método de diagnóstico dentre as técnicas testadas a MET (contrastação negativa para sua visualização e a imunomarcção com ouro coloidal para visualização e marcação do epítipo no agente)

A Hibridização *in situ* também se mostrou uma boa técnica para o diagnóstico do agente, porém pelo fato do *M. hyopneumoniae* apresentar uma alta variabilidade genotípica há necessidade de mais estudos no seu genoma para produção de sondas e otimizar o diagnóstico.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - NBR6023

ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. **Imunologia médica**. Atheneu, 1992.

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

BÆKBO, P. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: College of Veterinary Medicine. **International symposium on swine disease eradication**. St Paul, Minnesota: University of Minnesota, V.1, p.27-33, 2001.

BAILAO, A. M. et al. Kinases of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and strains of *Mycoplasma synoviae*: an overview. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 219-224, 2007.

BARCELLOS, D. Dinâmica da infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*: uma visão atual. In: Simpósio UFRGS sobre Produção, Reprodução e Sanidade Suína, 1, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre:2006. p.55.

BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; ALMEIDA, M. N. Programas de vacinação para diferentes sistemas de produção. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES, 13, 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis:ABRAVES, 2007, p.54-67.

BATISTA, L. et al. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, n.2, p.75-77, 2004.

BIONDO, N. **Estudo etiológico e patológico de pneumonias em javalis criados de forma confinada no estado do Rio Grande do Sul**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012

BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.34, p.103-110, 1959.

- BUCHENAU, I. et al. Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strains PG45. **Research in Veterinary Science**, v.89, p. 223-229, 2010.
- CHEN, J. R. et al. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v.80, p.347-357, 2001.
- CONCEIÇÃO, C. G.; TURNES, F. R. *Moraxella bovis*: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, 2003.
- CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Etiopatogenia e imunoprofilaxia da pneumonia enzoótica suína. **Ciência rural**, v. 36, n. 3, p. 1034-1042, 2006. ISSN 0103-8478.
- COSTA, M.M. ***Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: genes apxIVA e rDNA 16s**. Porto Alegre, 2002. 81f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- DAILIDAVI ČIEN Ė, J. e al. Typically definable respiratory lesions and their influence on meat characteristics in pigs. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.43, n.65, p.20-24, 2008.
- 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. ISSN 0019-9567.
- DEMINA, L. et al. Proteome of the bacterium *Mycoplasma gallisepticum*. **Biochemistry**, v.74, p.165-174, 2009.
- 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. 233-238, 2001.
- DJORDJEVIC, S. P. et al. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. **Infection and Immunity**, 72:2791-2802, 2004. ISSN 0019-9567.
- DONE, S. H. Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. **Veterinary Research**, 22: 582-586, 1991.

DORDET-FRISONI, E. et al. Chromosomal transfers in Mycoplasmas: when minimal genomes go mobile. **mBio**, v5(6), e01958-14, 2014.

DOŠEN, R. et al. The bacterial infections of respiratory tract of swine. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.23, n.5-6, p.237-243, 2007.

DOSTER, A. R.; LIN, B.C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immune peroxidase method. **Am. Journal Veterinary Research**, v.49: 1719-21, 1988.

DUBOSSON, C. R. et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.102, p.55–65, 2004. ISSN 0378-1135.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A suíno cultura no Brasil**. Disponível em:  
[http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5](http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=5).  
Acesso em: 21 de agosto 2014.

ERLANDSON K.R. et al. 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.

FAGAN, P. K. et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* ΔaroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). **Infection and Immunity**, v.65, p.2502-2507, 1997.

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

GIMENO, E. **Fundamentos de imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária**. Encontro Nacional de Patologia Veterinária, v. 7, p. 17-51, 1995.

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, n. 4, p. 255-263, 2009. ISSN 0167-5877.

HAESEBROUCK, F. et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect ?. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p.255-268, 2004. ISSN 0378-1135.

HANSEN, M.S. et al. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, p.120-131, 2010.

HARRIS, D.L. Multi-site pig production. **Ames: Iowa State University**, 217p, 2000.

HAYAT, M. A.; MILLER, S.E. Negative staining. New York, **Mc. Graw-Hill Publ. Company**. 1990. 253p.

HE, Y. et al. Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs in subtropical southern China. **Tropical Animal Health and Production** , v.43, p.695-698, 2011. ISSN 0049-4747.

HILLEN, S. et al. 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.

HSU, S.-M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981. ISSN 0022-1554.

HSU, T.; MINION, F.C. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. **Infection and Immunity**, 66:.4762-4766, 1998.

HURNIK, D.; HANNA, P. E.; DOHOO, I. R. Evaluation of rapid gross visual appraisal of swine lungs at slaughter as a diagnostic screen for enzootic pneumonia. Canadian, **Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 37, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), **Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, março 2014.

Instituto de Economia Agrícola (IEA). **Análise de Mercado de Proteínas Animais: suinocultura no Estado de São Paulo em 2014**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=13446>. Acesso em: 20 de setembro de 2014.

JORSAL, S.E.; THOMSEN, B.Y. A Cox Regression Analysis of Risk Factors Related to *Mycoplasma hyopneumoniae* Reinfection in Danish SPF-Herds. In: International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics – ISVEE, 5., 1988, Copenhagen. **Anais...**Copenhagen:ActaVeterinariaScandinavia, 1988, p.436-438.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9ª edição; Ed. Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

KIM, J.; CHUNG, H.-K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, n. 3, p. 251-256, 2003. ISSN 1090-0233.

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

KOBISCH, M. *Mycoplasma* diseases in pigs – Old diseases still causing trouble. In: The 16th International Pig Veterinarian Society Congress, 2000, Melbourne, Austrália, **Anais...** Melbourne, p.434-438, 2000.

KOBISCH, M. *Mycoplasma* diseases in pigs-old diseases still causing trouble. Proceedings of the International Pig Veterinarian Society Congress, 2000, Melbourne, Austrália, **Anais...** Melbourne p.17–20, 2000.

KNUTTON, S. Electron microscopical methods in adhesion. **Methods Enzymol**. v. 253, p.45-158, 1995.

LEON, E.A. et al. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.331-341, 2001. ISSN 0378-1135.

LI, B. et al. Transcripton analysis on response of porcine alveolar macrophages to co-infection of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Virus Research**, v.196, p.60-69, 2015.

LIN, J. H. et al. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.65, p.69-74, 2003.

MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.297-309, 2008. ISSN 0378-1135.

MAES, D. et al. Risk indicators for the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae*, porcine influenza viruses and Aujeszky's disease virus in slaughter pigs from fattening pigs herds. **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**, v.46, p.341-352, 1999.

MAES, D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: update on epidemiology and control. Proceedings of the 21st IPVS Congress Melbourne, Austrália, **Anais...** Melbourne. p.30-35, 2010.

MANILOFF, J. **Phylogeny of Mycoplasmas**. In: *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.549-559, 1992.

MATTSSON, J. G. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 4, p. 893-897, 1995. ISSN 0095-1137.

MESSIER, S.; ROSS, R. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. **American journal of veterinary research**, v. 52, n. 9, p. 1497-1502, 1991. ISSN 0002-9645.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Gráfica-Editora Michalany, 1990. p.40-112

MIMS, C.A.; PLAYFAR, J.H.; ROIT, I.M. **Estratégias para a sobrevivência dos parasitas e persistência da infecção**. In: JAWETZ, E. *Microbiologia Médica*. São Paulo: Manole, p.15.1-15.12., 1995.

MINION, F.C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, 186:7123-7133, 2004. ISSN 0021-9193.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Suínos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em: 21/08/2014.

MOREAU, I. A.; MILLER, A. Y.; BAHNSON, P.B. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M. hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vaccine**, v.22, p.2328-2333, 2004.

MORRIS, C.R. et al. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v.21, n.4, p.323-337, 1995

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

OTAKE, S. et al. 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.

POSÁ, R. et al. Use of computed tomography and histopathologic review for lung lesions produced by the interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and fumonisinmycotoxins in pigs. **Veterinary Pathology**, v.50(6), p.971-979, 2013.

QUINN, P.J. et al. **The Mycoplasmas (Class: Mollicutes)**. In: Clinical Veterinary Microbiology. Philadelphia: Elsevier, 2004. cap.35, p.320-326.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology** v.42, n.4, p.405-426, 2005.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998. ISSN 1092-2172.

REDONDO, E. et al. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.260-270, 2009.

ROCHA, E.P.C.; BLANCHARD, A. Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.2031-2042, 2002.

RODRÍGUEZ, F. et al. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, 130:306-312, 2004. ISSN 0021-9975.

ROSS, R.F. **Mycoplasma diseases**. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, p.495-510, 1999.

ROSS, R.F.; STEMKE, G.W. **Mycoplasma infections of swine**. In: TULLY, J.G. & RAZIN, S. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. New York: Academic Press,. v.2, p.275-281, 1995. ISSN 0125838069.

SANTOS, F. L. et al. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. **Veterinary Microbiology**, v.175, p.374-381, 2015.

SIBILA, M. et al. Use of polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus infection in pigs from farms with and without post-weaning multisystemic wasting syndrome, **AJVR**, 65:88-92, 2004.

SCHMIDT, J. A.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5790-5798, 2004. ISSN 0021-9193.

SCHWARTZ, K. J. O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL PFIZER DE PNEUMONIA ENZOÓTICA, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas. p.23-40, 2001.

SIBILA, M. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, n.3, p.221-231, 2009. ISSN 1090-0233.

SIRINARUMITR, T. et al. Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, n. 1, p. 68-71, 2001. ISSN 1040-6387.

SOBESTIANSKY, J. et al. 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. **Embrapa Suínos e Aves**, 2001, p. 1-6, ISSN 0100 – 8862.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Micoplasmoses**. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed.). Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007. p.159-176

SOBESTIANSKY, J. et al. **Pneumonia Enzoótica**. In: Clínica e Patologia Suína. p.361, 1999.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Pneumonia Enzoótica**. In: Clínica e Patologia Suína. p. 214-218, 1994.

SORENSEN, V. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evolution of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**. 54: 23-24, 1997. ISSN 0378-1135.

STÄRK, K. D. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine - a literature review. **The Veterinary Journal**, v. 159, n. 1, p. 37-56, 2000. ISSN 1090-0233.

STÄRK, K.D.C. et al. A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v.26, n.3, p.595-606, 2007. ISSN 0253-1933.

STRAW, B. E. **Diseases of Swine**. (Eds.), 1999. Diseases of Swine, 8 ed. Iowa State University Press, Ames, IO., p. 277-290, 1999.

STRAW, B. E.; SHIN, S. J.; YEAGER, A. E. Effect of pneumonia on growth rate and feed efficiency of minimal disease pigs exposed to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, n. 4, p. 287-294, 1990. ISSN 0167-5877.

SOKOLI, A. et al. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotropic mycoplasma. **Veterinary Research**, v.44, n.6, p. 1-12, 2013.

SOUZA, W.; et al. **Técnica Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Editor: Wanderley de Souza. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

THACKER, E.L. et al. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. **Journal of Swine health and production**, v.6, n.3, p.107-112, 1998.

THACKER B.J.; THACKER E.L. **Influence of maternally-derived antibodies on the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin**. In: Proceedings of AASV. Nashville, Tennessee. p.:513-515, 2001

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.

TOLEDO, M. A. **Detecção molecular de *Mycoplasma suis* em suínos de criações extensivas no Estado do Rio Grande do Norte**. 2015. Dissertação (Iniciação Científica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. **Artmed**, 2012. ISBN 8536326980.

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

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**. 97:177-190, 2003.

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

WALKER, R.L. **Mollicutes**. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.155-162.

WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. **Iowa State University Press**, 1994. ISBN 0813824915.

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.

WILTON, J.L. et al. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesion gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbiology**, 144: 1931-1943, 1998. ISSN 1350-0872.

YAMAMOTO, R. **Mollicutes**. In: BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y. *Tratado de microbiologia veterinária*. Zaragoza: Editorial Acribia. p.241-249, 1994.

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. ISSN 0019-9567.

ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. **Infection and Immunity**, 63: 1013-1019, 1995.

ZIELINSKI, G.; ROSS, R. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 8, p. 1262-1269, 1993. ISSN 0002-9645.

## **9. ANEXOS**

**9.1. Instrução Normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013**

**9.2. Certificado do CETEA**

**INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013.**

**MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E  
ABASTECIMENTO,**

no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da

Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, no art. 61, parágrafo único, do Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, e o que consta do Processo nº 21000.006555/2013-68, resolve:

Art. 1º Alterar a lista de doenças passíveis da aplicação de medidas de defesa sanitária animal, previstas no art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, publicado pelo Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa.

Art. 2º As doenças listadas no Anexo desta Instrução Normativa são de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial, composto pelas unidades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelos Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal, em atendimento ao art. 5º do Anexo do Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006.

§ 1º A notificação da suspeita ou ocorrência de doença listada no Anexo desta Instrução Normativa é obrigatória para qualquer cidadão, bem como para todo profissional que atue na área de diagnóstico, ensino ou pesquisa em saúde animal.

§ 2º A suspeita ou ocorrência de qualquer doença listada no Anexo desta Instrução Normativa deve ser notificada imediatamente, no prazo máximo de 24 (vinte e quatro) horas de seu conhecimento, quando:

0 - ocorrer pela primeira vez ou reaparecer no País, zona ou compartimento declarado oficialmente livre;

II - qualquer nova cepa de agente patogênico ocorrer pela primeira vez no País, zona ou compartimento;

III - ocorrerem mudanças repentinas e inesperadas nos parâmetros epidemiológicos como: distribuição, incidência, morbidade ou mortalidade de uma doença que ocorre no País, Unidade Federativa, zona ou compartimento; ou

IV - ocorrerem mudanças de perfil epidemiológico, como mudança de hospedeiro, de patogenicidade ou surgimento de novas variantes ou cepas, principalmente se houver repercussões para a saúde pública.

§ 3º A notificação também deverá ser imediata para qualquer outra doença animal que não pertença à lista do Anexo desta Instrução Normativa, quando se tratar de doença exótica ou de doença emergente que apresente índice de morbidade ou mortalidade significativo, ou que apresente repercussões para a saúde pública.

Art. 3º Os procedimentos, prazos, documentos para registro, fluxo, periodicidade de informações e outras disposições necessárias para cumprimento desta Instrução Normativa devem seguir o estabelecido em normas próprias da Secretaria de Defesa Agropecuária propostas pelo Departamento de Saúde Animal.

Parágrafo único. O serviço veterinário oficial deverá manter os meios necessários para captação e registro de notificações.

Art. 4º Independentemente da lista de que trata esta Instrução Normativa, a ocorrência de doenças animais deve ser informada ao serviço veterinário oficial

conforme exigências e requisitos específicos que constem de certificados internacionais com objetivo de exportação.

Art. 5º A lista de doenças animais de que trata esta Instrução Normativa será revista por proposta do Departamento de Saúde Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária, e publicada periodicamente, considerando alterações da situação epidemiológica do País e mundial, resultados de estudos e investigações científicas, recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal, ou sempre que se impuser o interesse de preservação da saúde animal no País.

Art. 6º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

## ANTÔNIO ANDRADE

### ANEXO

#### Lista de doenças de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial

1. Doenças erradicadas ou nunca registradas no País, que requerem notificação imediata de caso suspeito ou diagnóstico laboratorial:

- a) Múltiplas espécies
  - *Brucelose (Brucella melitensis)*
  - Cowdriose
  - Doença hemorrágica epizootica
  - Encefalite japonesa
  - Febre do Nilo Ocidental
  - Febre do Vale do Rift
  - Febre hemorrágica de Crimeia-Congo
  - *Miíase (Chrysomya bezziana)*
  - Peste bovina
  - Triquinelose
  - Tularemia
- b) Abelhas
  - Infestação das abelhas melíferas pelos ácaros *Tropilaelaps*
  - Infestação pelo pequeno escaravelho das colmeias (*Aethina tumida*)
- c) Aves
  - Hepatite viral do pato
  - Influenza aviária
  - Rinotraqueíte do peru
- d) Bovinos e bubalinos
  - Dermatose nodular contagiosa
  - Pleuropneumonia contagiosa bovina
  - Tripanosomose (transmitida por *tsetse*)
- e) Camélídeos
  - Varíola do camelo
- f) Equídeos
  - Arterite viral equina
  - *Durina/sífilis (Trypanosoma equiperdum)*

- Encefalomielite equina venezuelana
- Metrite contagiosa equina
- Peste equina
- g) Lagomorfos
  - Doença hemorrágica do coelho
- h) Ovinos e caprinos
  - Aborto enzoótico das ovelhas (clamidiose)
  - Doença de Nairobi
  - Maedi-visna
  - Peste dos pequenos ruminantes
  - Pleuropneumonia contagiosa caprina
  - Variola ovina e variola caprina
- i) Suínos
  - Encefalomielite por vírus Nipah
  - Doença vesicular suína
  - Gastroenterite transmissível
  - Peste suína africana
  - Síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS)

**Obs.:** independentemente da relação de doenças listadas acima, a notificação obrigatória e imediata inclui qualquer doença animal nunca registrada no País.

2. Doenças que requerem notificação imediata de qualquer caso suspeito:

- a) Múltiplas espécies
  - Antraz (carbúnculo hemático)
  - Doença de Aujeszky
  - Estomatite vesicular
  - Febre aftosa
  - Língua azul
  - Raiva
- a) Abelhas
  - Loque americana das abelhas melíferas
  - Loque europeia das abelhas melíferas
- b) Aves
  - Doença de Newcastle
  - Laringotraqueíte infecciosa aviária
- c) Bovinos e bubalinos
  - Encefalopatia espongiiforme bovina
- d) Equídeos
  - Anemia infecciosa equina
  - Encefalomielite equina do leste
  - Encefalomielite equina do oeste
  - Mormo
- e) Ovinos e caprinos
  - Scrapie
- f) Suínos
  - Peste suína clássica

3. Doenças que requerem notificação imediata de qualquer caso confirmado:

- a) Múltiplas espécies
    - *Brucelose (Brucella suis)*
    - Febre Q
    - Paratuberculose
  - b) Aves
    - Clamidiose aviária
    - *Mycoplasma (M. gallisepticum; M. melleagrídis; M. synoviae)*
    - *Salmonella (S. enteritidis; S. gallinarum; S. pullorum; S. typhimurium)*
  - c) Bovinos e bubalinos
    - *Brucelose (Brucella abortus)*
    - Teileriose
    - Tuberculose
  - d) Lagomorfo
    - Mixomatose
  - e) Ovinos e caprinos
    - Agalaxia contagiosa
4. Doenças que requerem notificação mensal de qualquer caso confirmado:
- a) Múltiplas espécies
    - Actinomicose
    - *Botulismo (Clostridium botulinum)*
    - Carbúnculo sintomático/manqueira (*Clostridium chauvoei*)
    - Cisticercose suína
    - *Clostridioses (exceto C. chauvoei, C. botulinum, C. perfringens e C. tetani)*
    - Coccidiose
    - Disenteria vibrionária (*Campilobacter jejuni*)
    - Ectima contagioso
    - *Enterotoxemia (Clostridium perfringens)*
    - Equinococose/hidatidose
    - Fasciolose hepática
    - Febre catarral maligna
    - Filariose
    - Foot-rot/podridão dos cascos (*Fusobacterium necrophorum*)
    - Leishmaniose
    - Leptospirose
    - Listeriose
    - *Melioidose (Burkholderia pseudomallei)*
    - *Miíase por Cochliomyia hominivorax*
    - Pasteureloses (exceto *P. multocida*)
    - Salmonelose intestinal
    - Tripanosomose (*T. vivax*)
    - *Tétano (Clostridium tetani)*
    - Toxoplasmose
    - *Surra (Trypanosoma evansi)*
  - b) Abelhas
    - Acariose/acarapisose das abelhas melíferas
    - Cria giz (*Ascosphaera apis*)
    - Nosemose
    - Varrose (varroa/varroase)

- c) Aves
  - Adenovirose
  - Anemia infecciosa das galinhas
  - Bronquite infecciosa aviária
  - Coccidiose aviária
  - Colibacilose
  - Coriza aviária
  - Doença de Marek
  - Doença infecciosa da bursa/Doença de Gumboro
  - EDS-76 (Síndrome da queda de postura)
  - Encefalomielite aviária
  - Epitelioma aviário/bouba/varíola aviária
  - Espiroquetose aviária (*Borrelia anserina*)
  - Leucose aviária
  - Pasteurelose/cólera aviária
  - Reovirose/artrite viral
  - Reticuloendoteliose
  - Salmoneloses (exceto *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium*)
  - Tuberculose aviária
- d) Bovinos e bubalinos
  - Anaplasmosse bovina
  - Babesiose bovina
  - *Campilobacteriose genital bovina* (*Campilobacter fetus* subsp. *veneralis*)
  - Diarreia viral bovina
  - Leucose enzoótica bovina
  - Rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa
  - Septicemia hemorrágica (*Pasteurella multocida*)
  - Variola bovina
  - Tricomonose
- e) Equídeos
  - Adenite equina/papeira/garrotilho
  - Exantema genital equino
  - Gripe equina
  - *Linfangite ulcerativa* (*Cornebacterium pseudotuberculosis*)
  - Piroplasmose equina
  - Rinopneumonia equina
  - Salmonelose (*S. abortusequi*)
- f) Ovinos e caprinos
  - Adenomatose pulmonar ovina
  - Artrite-encefalite caprina
  - Ceratoconjuntivite ricketsiana
  - Epididimite ovina (*Brucella ovis*)
  - Linfadenite caseosa
  - Salmonelose (*S. abortusovis*)
  - Sarna ovina
- g) Suínos
  - Circovirose
  - Erisipela suína
  - Influenza dos suínos
  - Parvovirose suína

- *Pneumonia enzoótica (Mycoplasma hyopneumoniae)*
- Rinite atrófica



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 138/14 sobre o projeto: “Implementação de técnicas moleculares e microscopia eletrônica de transmissão para pesquisa de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos” sob a responsabilidade de **Márcio Hipólito**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

São Paulo, 17 de dezembro de 2014

**Ricardo Spacagna Jordão**  
Coordenador da CETEA-IB