

LEONARDO TEÓFILO TOLEDO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM MODELO SUÍNO COM ISOLADOS
BRASILEIROS DE *Mycoplasma hyopneumoniae*: AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE E RESPOSTA IMUNE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Abelardo Silva Junior

Coorientadores: Carlos Eduardo Real Pereira
Ricardo Seiti Yamatogi
Luís Guilherme de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T649i
2023 Toledo, Leonardo Teófilo, 1996-
Infecção experimental em modelo suíno com isolados
brasileiros de *Mycoplasma hyopneumoniae*: avaliação da
patogenicidade e resposta imune / Leonardo Teófilo Toledo. –
Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (78 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Abelardo Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Referências bibliográficas: f. 66-74.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.402>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Suínos - Doenças. 2. Infecções respiratórias.
3. Virulência. 4. Patologia experimental. I. Silva Júnior,
Abelardo, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.40896241


LEONARDO TEÓFILO TOLEDO

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM MODELO SUÍNO COM ISOLADOS
BRASILEIROS DE *Mycoplasma hyopneumoniae*: AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE E RESPOSTA IMUNE**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 LEONARDO TEOFILO TOLEDO
Data: 27/06/2023 14:47:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Leonardo Teófilo Toledo
Autor

Documento assinado digitalmente
 ABELARDO SILVA JUNIOR
Data: 27/06/2023 16:14:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Abelardo Silva Júnior
Orientador

A Deus por me conceder a vida,

Aos meus pais, Vilmar e Maria, pelo amor, educação e incentivo incondicional,

Aos amigos que se tornaram família (Haroldo, Júlio, Rômulo, Kaique, Mairon e Caio Henrique),

A todos os mestres que gentilmente compartilharam seu conhecimento,

Aos animais que doam suas vidas diariamente em prol da humanidade,

Meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Confesso que é desafiador resumir em poucos caracteres todos os agradecimentos acumulados de 26 anos de vida. Então vamos lá! Agradeço a deus por me conceder o dom da vida e, junto dela, sempre me apresentar as pessoas certas ao longo do caminho.

Agradeço à minha família na figura dos meus pais (Vilmar e Maria), por todo incentivo, amor e sacrifício. Por diariamente durante anos levantarem antes das 6h da manhã, prepararem o café e me acordarem para que eu fosse a escola. Sem vocês nada seria possível! Este título eu dedico inteiramente a vocês.

Agradeço a todos os mestres que tive ao longo da minha trajetória, desde aqueles que me ensinaram o mais simples movimento de segurar um lápis, aos que me apresentaram o "universo" da biologia molecular. Em especial agradeço ao meu orientador Dr. Abelardo. Obrigado pela confiança, respeito, ensinamentos e principalmente pelo reconhecimento do meu trabalho. Sem o apoio do senhor nada seria possível! Aos meus coorientadores Dr. Carlos Eduardo, Dr. Luís Guilherme (e todos do Laboratório de medicina de suínos) e Dr. Ricardo por todo conhecimento e auxílio concedido em minha formação. Em especial ao professor Ricardo por todas as conversas, cafés e conhecimento transmitido, principalmente por me ensinar a diluir uma curva padrão de qPCR perfeita! À Fernanda e ao Arthur por toda a amizade e conversas descontraídas no departamento, vocês fizeram a pós-graduação ser mais leve. Aos doutores João Paulo Oliveira e Bruno Damasceno que foram essenciais em minha formação acadêmica. A todos os estagiários que tive, em especial Caio Augustus e Ana Alice. A todos que me auxiliaram no estudo, em especial ao Victor Hugo Rabelo.

Agradeço a todos os funcionários das granjas de Nutrição e Melhoramento Genético de suínos da UFV, nas quais fui estagiário por longos anos! Também agradeço a todos os integrantes da Coles Farm (NC-USA), vocês foram uma família durante meu intercâmbio!

Agradeço a todos os amigos que em todos estes anos de UFV foram uma segunda família, em especial Haroldo, Júlio, Rômulo, Kaique, Mairon e Caio Henrique.

Agradeço à empresa Agrocere PIC na figura do Médico Veterinário Ms. Gustavo Simão por fornecer os animais. Meu mais profundo respeito e agradecimento a todos os animais que diretamente e indiretamente doaram suas vidas neste estudo em prol da ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da minha bolsa de mestrado. Ao DVT-UFV.

Por fim, agradeço à UFV! Esta que me acolheu e literalmente foi minha casa, a quem tenho um profundo sentimento que se traduz em dizer: **ORGULHO DE SER UFV!**

Quando você perceber que, para produzir, precisa obter a autorização de quem não produz nada; quando comprovar que o dinheiro flui para quem negocia não com bens, mas com favores; quando perceber que muitos ficam ricos pelo suborno e por influência, mais que pelo trabalho, e que as leis não nos protegem deles, mas, pelo contrário, são eles que estão protegidos de você; quando perceber que a corrupção é recompensada, e a honestidade se converte em autossacrifício; então poderá afirmar, sem temor de errar, que sua sociedade está condenada.

(Ayn Rand)

RESUMO

TOLEDO, Leonardo Teófilo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Infecção experimental em modelo suíno com isolados brasileiros de *Mycoplasma hyopneumoniae*: Avaliação da patogenicidade e resposta imune.** Orientador: Abelardo Silva Júnior. Coorientadores: Carlos Eduardo Real Pereira, Luís Guilherme de Oliveira e Ricardo Seiti Yamatogi

O *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) é considerado o causador primário da pneumonia enzoótica suína (PES). Diante disso, a obtenção de novos isolados patogênicos e estudos acerca da patogenicidade e mecanismos de resposta imune se fazem necessários. Este trabalho realizou uma infecção experimental em modelo suíno para avaliar a patogenicidade de dois isolados de Mhyo (UFV01 e UFV02). O estudo foi dividido em 3 grupos, sendo um grupo controle negativo (n=4) e dois grupos testes contendo (n=8). Eles foram desafiados aos 35 dias de idade por via intratraqueal com 10^7 CCU (Color Change Unit). Foram coletadas amostras de swab laringeal e soro nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 pós inoculação (dpi) para avaliar a soroconversão, citocinas e excreção do agente por qPCR. Ao fim, todos foram eutanasiados para avaliar o escore das lesões macro e microscópicas dos pulmões e a carga bacteriana por qPCR. O grupo UFV01 teve uma soroconversão (IgG) mais precoce e maior (100%), enquanto apenas 50% dos animais do grupo UFV02 soroconverteu, o mesmo resultado foi obtido quando analisado a presença de IgA em lavado traqueobrônquico (LTB) aos 35 dias de infecção. O Grupo UFV01 apresentou aos 35 dias score de lesão macroscópica média de 11,75 % e o UFV02 3,125%. As lesões microscópicas foram mais intensas no grupo UFV01, apresentando maior frequência de lesões moderadas de hiperplasia de BALT, broncopneumonia e casos de pleurite. As amostras de swab laringeal o início da detecção se deu aos 14 dias. O grupo UFV01 teve 75% positividade aos 14dpi ($3,76 \times 10^2$), 87,5% aos 21dpi ($4,36 \times 10^2$), 100% aos 28dpi ($1,44 \times 10^3$) e 87,5% aos 35dpi ($1,25 \times 10^4$). Já o grupo UFV02 também iniciou sua excreção aos 14dpi, porém com uma positividade de 37,5% ($1,82 \times 10^2$), aos 21dpi 75% ($8,33 \times 10^2$), 28dpi (87,50%) e aos 35dpi 87,5% ($2,5 \times 10^3$). Já a carga bacteriana média detectada no LTB, tecido e swab lesão aos 35dpi foi de $3,57 \times 10^5$, $2,63 \times 10^6$ cópias/ μ L e $6,69 \times 10^4$ cópias/ ng de DNA total, respectivamente para o grupo UFV01 e $6,32 \times 10^6$, $3,92 \times 10^6$ cópias/ μ L e $7,18 \times 10^4$ cópias/ ng de DNA para o grupo UFV02. Os resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de vacinas, kits de diagnóstico e estabelecimento de modelos para testes de protocolos terapêuticos contra esse agente.

Palavras-chave: UFV01. UFV02. Doença respiratória. Desafio experimental. Suíno.

ABSTRACT

TOLEDO, Leonardo Teófilo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Experimental infection in a swine model with Brazilian isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae*: Evaluation of pathogenicity and immune response.** Adviser: Abelardo Silva Júnior. Co-advisers: Carlos Eduardo Real Pereira, Luís Guilherme de Oliveira and Ricardo Seiti Yamatogi

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) is the primary cause of swine enzootic pneumonia (PES). Therefore, the acquisition of new pathogenic isolates and studies on pathogenicity and immune response mechanisms are necessary. In this sense, this work carried out an experimental infection in a swine model to evaluate the virulence of two Brazilian Mhyo isolates entitled UFV01 and UFV02. The study was divided into three groups, one negative control group (n=4) and two containing test groups (n=8). They were challenged at 35 days of age intratracheally with Mhyo 10⁷CCU (Color Change Unit). Laryngeal swabs and serum samples were collected on days 0, 7, 14, 21, 28 and 35 post-infection (dpi) to assess seroconversion and agent excretion by qPCR. In the end, all were euthanized to evaluate the score of macro and microscopic lesions of the lungs and the bacterial load present by qPCR. The UFV01 group had an earlier and greater seroconversion (IgG) (100%) while only 50% of the UFV02 group seroconverted; the same result was obtained when analyzing the presence of IgA in tracheobronchial lavage (LTB) at 35 days of infection. The UFV01 Group presented a mean macroscopic lesion score of 11.75% at 35 days and the UFV02 3.125%. The microscopic lesions were more intense in the UFV01 group, with a higher frequency of moderate lesions of BALT hyperplasia, bronchopneumonia and cases of pleuritis. The laryngeal swab samples were evaluated by qPCR, detection began after 14 days. The UFV01 group had 75% positivity at 14dpi (3.76x10²), 87.5% at 21dpi (4.36x10²), 100% at 28dpi (1.44x10³) and 87.5% at 35dpi (1.25x10⁴). The UFV02 group also started its excretion at 14dpi, but with the positivity of 37.5% (1.82x10²), at 21dpi 75% (8.33x10²), 28dpi (87.50%) and at 35dpi 87.5% (2.5x10³). The mean bacterial load detected in the LTB, tissue and lesion swab at 35dpi was 3.57x10⁵, 2.63x10⁶ and 6.69x10⁴ copies/μL, respectively for the UFV01 group and 6.32x10⁶, 3.92x10⁶ and 7.18x10⁴ copies/μL for the UFV02 group. The results can help in the development of new vaccines, diagnostic kits and establishment of experimental models for testing therapeutic protocols against this agent.

Keywords: UFV01. UFV02. Respiratory disease. Experimental challenge. Swine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Dendrograma da última atualização do Genomic Blast de 23 isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae* depositados até o janeiro de 2023 (NCBI). OBS: Neste alinhamento não contem os isolados UFV01, UFV02 e LE.....29
- Figura 2:** A - baias onde foram alojados os animais, B - Momento da recepção dos animais (fotos de arquivo pessoal).....34
- Figura 3:** Colônias de *Mycoplasma hyopneumoniae*. A - Colônias de aspecto liso isolado UFV01 aumento 20x. B - Colonias rugosas isolado UFV02, aumento 10x. (EVOS XL Core)36
- Figura 4:** A - Procedimento de intubação para inoculação do isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae*. B - Coleta de swab laringeal (Fotos de arquivo pessoal)37
- Figura 5:** Gráfico avaliação frequência de tosse. Grupo controle (laranja). B- Grupo UFV01 (Azul). C- Grupo UFV02 (Verde).....43
- Figura 6:** Gráfico de barras em uma escala de 0% (sem lesões) a 100% (pulmão todo afetado). * Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$)44
- Figura 7:** Fotos Individuais dos animais do grupo controle (A, B, C e D), UFV01 (E, F, G, H, I, J, K e L) e UFV02 (M, N, O, P, Q, R, S e T)45
- Figura 8:** Gráfico barras com as frequências lesões microscópicas discriminados em lesões de broncopneumonia, hiperplasia de BALT e Pleurite associados aos graus de lesão dos pulmões dos grupos de animais CN, UFV01 e UFV02.....46
- Figura 9:** A- pulmão de um animal do grupo controle totalmente sem lesões, B-C Focos de hiperplasia de BALT discreta (círculos) e broncopneumonia (setas), D- Pleurite (seta).....48
- Figura 10:** Gráfico BoxPlot dinâmica da soroconversão de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. A- Comparação estatística da soroconversão entre os grupos dentro do mesmo dia. B- Comparação estatística da soroconversão dentro do tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$)50
- Figura 11:** Gráfico BoxPlot detecção de anticorpos IgA anti-Mhyo em lavado traqueobrônquico aos 35 dias pós de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$)51
- Figura 12:** Gráfico BoxPlot dinâmica de detecção de cópias de fragmento do gene P102 de *Mycoplasma hyopneumoniae* em swab laringeal de suínos inoculados experimentalmente

com isolados UFV01 e UFV02. A- Comparação estatística da excreção entre os grupos dentro do mesmo dia. B- Comparação estatística da excreção dentro do tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$)52

Figura 13: Quantificação IgG no soro e % de qPCR positivos grupos. A- Grupo UFV01. B- Grupo UFV02.....54

Figura 14: Gráfico BoxPlot detecção de cópias de fragmento do gene P102 de *Mycoplasma hyopneumoniae* de suínos inoculados experimentalmente com isolados UFV01 e UFV02. A- Detecção em lavado traqueobrônquico. B- Detecção em tecido pulmonar lesionado. C- Detecção em swab de tecido pulmonar lesionado. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey dentro do tratamento ($p < 0,05$). Gráfico de correlação por regressão linear simples. D- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana lavado traqueobrônquico. E- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana tecido. E- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana swab lesão.....56

Figura 15: Gráfico BoxPlot dinâmica de detecção citocinas no soro de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. A- Detecção anti-inflamatória IL-10 em pg/mL. B- Detecção citocina pro inflamatória TNF alpha em pg/mL.....57

Figura 16: Fotos lesões do animal E pertencente ao grupo UFV01. Estão sendo apontadas as lesões de acometimentos secundário.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: 26 genomas sequenciados e depositados na base de dados GenBank.....	30
Tabela 2: Avaliação do índice de lesões macroscópicas dos grupos Controle, UFV01 e UFV02 aos 35 dias de infecção por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> variando de 0 a 100%.....	44
Tabela 3: Descrição das lesões microscópicas quantificadas (broncopneumonia, hiperplasia BALT e pleurite)	47
Tabela 4: Dinâmica da soroconversão de suínos inoculados experimentalmente com <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> com isolados UFV01 e UFV02.....	49
Tabela 5: Detecção anticorpos IgA em lavado traqueobrônquico de suínos inoculados experimentalmente com <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> com isolados UFV01 e UFV02. Os anticorpos foram detectados usando o ELISA modificado (kit Mhyo ab, IDEXX, EUA)	51
Tabela 6: Detecção de cópias de fragmento do gene P102 de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em swab laringeal de suínos inoculados experimentalmente com isolados UFV01 e UFV02.....	53
Tabela 7: Detecção de cópias de fragmento do gene P102 de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> em lavado traqueobrônquico, tecido lesionado e swab do tecido lesionado aos 35 dias pós infecção.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- (ABPA) Associação Brasileira de Proteína Animal
- (PES) Pneumonia Enzoótica suína
- (Mhyo) *Mycoplasma hyopneumoniae*
- (IAV) vírus Influenza A
- (Pm) *Pasteurella multocida*
- (FA) Imunofluorescência
- (IHC) Imuno-histoquímica
- (FISH) hibridização *in situ* fluorescente
- (PCR) Reação em cadeia da polimerase
- (LVB) lavados traqueobrônquico
- (ELISA) Ensaio de imunoadsorção enzimática
- (IL-1) Interleucina -1
- (IL-2) Interleucina -2
- (IL-6) Interleucina -6
- (IL-8) Interleucina -8
- (IL-12) Interleucina -12
- (IL-10) Interleucina -10
- (IFN- γ) Interferon Gama
- (TNF- α) Fator de necrose tumoral
- (LAMP) Lipídeos associados a membrana plasmática
- (IgA) Imunoglobulina A
- (IgG) Imunoglobulina G
- (LTB) Lavado traqueobrônquico
- (DO) Densidade óptica
- (DOa) Densidade óptica amostra
- (CPx) Controle positivo
- (CNx) Controle negativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Caracterização do agente	17
2.2. Epidemiologia.....	17
2.3. Diagnóstico.....	19
2.4. Patogenia e fatores de virulência.....	20
2.5. Variabilidade genética.....	21
2.6. Sinais clínicos e lesões.....	23
2.7. Resposta imune	24
2.8. Prevenção e controle.....	26
2.9. Isolados Caracterizados.....	27
2.1.1. Estudos Experimentais.....	31
3. OBJETIVO GERAL.....	33
3.1. <i>Objetivos Específicos</i>	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Normas para experimentação animal.....	34
4.2. Amostragem/ Seleção de suínos.....	34
4.3. Monitoramento temperatura das instalações.....	35
4.4. Avaliação dos sinais clínicos	35
4.5. Origem, cultivo e quantificação dos isolados.....	35
4.6. Infecção experimental.....	36
4.7. Clonagem para padronização da qPCR.....	37
4.8. Extração de DNA.....	38
4.9. PCR Endógeno.....	38
4.1.1. Detecção de cópias de DNA de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	39
4.1.2. Lavado traqueobrônquico.....	39
4.1.3. Lesões macroscópicas.....	40
4.1.4. Coleta de amostra de tecido pulmonar.....	40
4.1.5. Lesões microscópicas.....	40
4.1.6. ELISA, detecção de anticorpos anti-Mhyo (IgG) e (IgA).....	41
4.1.7. Detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	41

4.1.8. Diagnóstico diferencial	42
4.1.9. Análise Estatística.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Avaliação tosse.....	43
5.2. Lesões macroscópicas.....	43
5.3. Lesões microscópicas.....	46
5.4. Ensaio de ELISA para classe IgG.....	49
5.5. ELISA IgA lavado traqueobrônquico.....	51
5.6. qPCR swab laringeal.....	52
5.7. Quantificação IgG no soro e % de qPCR positivos grupos UFV01 e UFV02.....	52
5.8. qPCR lavado traqueobrônquico, tecido e swab tecido lesionado.....	54
5.9. Citocinas.....	56
5.1.1. Diagnóstico Diferencial.....	57
5.1.2. Mortalidade.....	58
6.DISSCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES E PESPECTIVAS.....	65
8. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE A.....	75
APÊNDICE B.....	76
ANEXO 1	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

A carne suína é a mais consumida no mundo. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína, com volume produzido em 2021 de 4,7 milhões de toneladas, das quais 1,13 foram exportadas e alojadas 2,015 milhões de matrizes suínas (ABPA, 2021).

No Brasil, prevalências elevadas de lesões pulmonares em suínos revelam uma possível deficiência nas condições sanitária, de manejo e das instalações na suinocultura brasileira (TAKEUTI E BARCELLOS, 2017; DE CONTI et al., 2021). Altos desafios infecciosos, metodologias de controle e tratamento ineficientes, superlotação, excesso de poeira, gases tóxicos, temperatura, umidade inadequadas, presença de micotoxinas imunossupressoras na ração e ausência de vazios sanitários são fatores de risco importantes para a ocorrência de pneumonias.

A Pneumonia enzootica suína (PES) é uma doença crônica, infecciosa causada primariamente pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), caracterizada por uma broncopneumonia catarral, que clinicamente se manifesta por tosse seca, atraso no ganho de peso, alta morbidade e baixa mortalidade (MAES et al., 2017; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, 2012).

As infecções causadas por Mhyo são praticamente presentes em todos os países onde se criam suínos no mundo. A prevalência nas granjas é alta, apesar de haver poucos dados publicados, sendo muitos deles avaliações de prevalência local (PIETERS E MAES, 2020). Acarretam consideráveis perdas econômicas devido à significativa perda de peso dos animais, gastos com tratamento e redução de preços das carcaças (THACKER E MINION, 2010). A Suíça é uma exceção onde a prevalência de granjas positivas é inferior a 1% após a conclusão de um programa de erradicação a nível nacional (PIETERS E MAES, 2020).

As condições de manejo e alojamento que predispõem à infecção são conhecidas, mas são necessárias mais pesquisas para entender melhor o padrão de transmissão em sistemas modernos de produção de suínos e avaliar a importância da população reprodutora para o controle de doenças (MAES et al., 2017).

No Brasil, estima-se que 95% das granjas comerciais sejam positivas para a Mhyo (TAKEUTI E BARCELLOS, 2017). No estado de São Paulo um estudo avaliou o soro de animais não vacinados provenientes de 14 propriedades, foi encontrada uma soropositividade de 52% das amostras (VICENTE et al., 2013). Arenales et al. (2022) em seu estudo avaliaram

os padrões histopatológicos das doenças respiratórias no Brasil, em se tratando do Mhyo encontraram uma positividade de 42,3% dos pulmões testados, muitos deles com patógenos respiratórios associados (bacterianos e virais). Em outro estudo conduzido no Sul do país, foram coletados 150 pulmões de 5 frigoríficos distintos, na qual foi possível observar lesão sugestiva de infecção concomitante pelo vírus Influenza A (IAV) e Mhyo, correspondendo a 55,3% (83/150), e em 54,2% (45/83) desses casos *Pasteurella multocida* (*Pm*) tipo A foi isolada (DE CONTI et al., 2021). Baraldi et al. (2019) estudou a soroprevalência de Mhyo em granjas vacinadas no estado de São Paulo encontrando uma prevalência de 27,7% nas creches, 43,7% crescimento, 68,8% terminação e 80 %, além de 12% área de consolidação pulmonar, 9% de pleurite no abate e 79,8% dos animais apresentavam algum grau de consolidação. Já Galdeano et al. (2019) no estado de Goiás encontrou uma soroprevalência de creche de 22,42%, crescimento 24,21%, terminação 61,7% e abate 88,36%, e área de consolidação media no abate de 7,29% e 10,33% de pleurite. 80,33% dos animais no momento do abate apresentaram algum grau de consolidação pulmonar. Apesar da impossibilidade de diferenciação dos anticorpos vacinais de infecções naturais é sabido que os anticorpos vacinais alcançam seu pico pós vacinação e decrescem ao longo do tempo. Porém nestes dois estudos pode ser observado justamente um aumento crescente da soroprevalência, ao longo das fases de produção possivelmente decorrente de infecções naturais. Apesar de existirem poucos estudos no Brasil acerca da prevalência do Mhyo, e os existentes serem de uma abrangência regional, se pode observar que a PES é endêmica em todas as regiões produtoras do país, e causam consideráveis perdas econômicas a atividade.

A longa persistência da bactéria no trato respiratório do suíno dificulta a realização de programas de erradicação em granjas comerciais (TAKEUTI E BARCELLOS, 2017). As perdas econômicas podem variar U\$6,55 até U\$ 10,12 por animal abatido (GILLESPIE, 2013; HADEN et al., 2012; GARZA-MORENO et al., 2018; FERRAZ et al., 2020). Portanto, apesar de variações do impacto econômico, provavelmente, relacionadas a variáveis individuais do local do estudo ou a patogenicidade da cepa infectante, é notório o impacto econômico causado pela infecção pelo Mhyo. Além disso, esses estudos não detalharam as condições de desafios secundários, situações frequentes que caracterizam a PES e agrava as condições de saúde e zootécnica do rebanho.

Atualmente existem vacinas disponíveis que não conferem proteção completa, entretanto existem pesquisas em andamento sobre o desenvolvimento de novas vacinas que confirmam imunidade protetora e reduzem a transmissão (MAES et al., 2017). Para isto os estudos experimentais são ideais para descrever a dinâmica de infecção da bactéria, pois as

condições são padronizadas. No entanto, a extrapolação dos resultados para a infecção de campo deve ser realizada com cuidado, pois os resultados podem ser afetados por várias condições que provavelmente não estão presentes no nível experimental (GARCIA-MORANTE et al., 2022).

Diante de todo o cenário apresentado, o estudo proposto é de grande importância, visto que até o presente momento no Brasil existem apenas dois isolados brasileiros de Mhyo completamente caracterizados (7422 e 7448) (SIQUEIRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2005) Neste estudo foram utilizados novos isolados (UFV01 e UFV02) (GONZAGA et al., 2019) visando a padronização do modelo de infecção pelo Mhyo e a caracterização da sua virulência. A partir dos resultados encontrados, novos estudos para o desenvolvimento de candidatos vacinais, medicamentos antimicrobianos, kits de diagnóstico e aperfeiçoamento das práticas de controle poderão ser realizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização do agente

O Mhyo é o agente primário da pneumonia enzootica, pertencente ao Filo *Firmicutes* e à classe *Mollicutes*, possuem genoma reduzido, com 0,2 a 0,3 µm de diâmetro, não possuem parede celular, com morfologia variada sendo sua biologia molecular semelhante à das bactérias gram-positivas (KOBISCH & FRIIS, 1996; SIMIONATTO et al., 2013).

Os Mollicutes são parentes distantes dos Gram positivos (*Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Acholeplasma*) surgiram por evolução “degenerativa” ou “regressiva” (RYCROFT, 2020).

O organismo é encontrado principalmente na superfície da mucosa da traqueia, brônquios e bronquíolos. Diferentes adesinas e lipoproteínas estão envolvidas no processo de adesão. A destruição do aparelho mucociliar, juntamente com a modulação da resposta imune, aumentam a suscetibilidade de suínos infectados a patógenos secundários. Os sinais clínicos e a gravidade das lesões dependem de diferentes fatores, como manejo, condições ambientais e da virulência da cepa, apesar do impacto potencial da variabilidade da cepa na gravidade da doença não estar bem definido (MAES et al., 2018).

Em geral, os mecanismos pelos quais micoplasmas causam doenças muitas vezes permanecem obscuros. Pelo fato dos micoplasmas serem tão diferentes de muitos outros patógenos estudados, há uma oportunidade limitada de reconhecer genes homólogos conhecidos em outros patógenos (RYCROFT, 2020).

Mesmo especificamente dentro dos *Mycoplasmas* há cepas consideradas patogênicas e não patogênicas que compartilham genes conhecidos por codificarem fatores de virulência, tornando assim mais difícil a sua compreensão. O que está claro é que os mecanismos de adesão e lipoproteínas são essenciais no processo de desenvolvimento da PES (LEAL ZIMMER et al., 2020).

2.2. Epidemiologia

Uma compreensão clara da epidemiologia do Mhyo é fundamental para o controle e prevenção da doença (PIETERS et al., 2020).

O Mhyo é um patógeno de distribuição mundial e específico de suínos (*Sus scrofa domesticus*) e javalis (*Sus scrofa scrofa*) (MAES et al., 2008). A dinâmica de transmissão é

dependente de inúmeros fatores como patogenicidade de cepa, densidade populacional, condições sanitárias, vacinações contra Mhyo (MAES et al., 2018).

A infecção com Mhyo ocorre através do contato das vias respiratórias do hospedeiro com secreções contaminadas com a bactéria. A principal via de contágio se dá no contato de um hospedeiro contaminado com um suscetível pelo contato nasal, compartilhamento de mesmo alojamento ou em raros casos transmissão no ar em distâncias maiores. Outros hospedeiros susceptíveis, não foram demonstrados até o momento (PIETERS et al., 2020).

Pieters et al. (2009) avaliaram a dinâmica de infecção em animais previamente negativos utilizando a cepa 232 (USA) numa infecção experimental. Este estudo demonstrou a tamanha cronicidade da infecção, pois ainda foi capaz de se detectar o Mhyo aos 214 dias pós infecção.

O primeiro evento de exposição se dá no período lactacional, quando os leitões entram em contato com as fêmeas que estão com eliminação ativa do agente (MALMSTEN et al., 2018; CALSAMIGLIA; PIJOAN, 2000). Conseqüentemente o número de matrizes positivas no momento do parto é determinante para transmissão do agente nas fases subsequentes de produção.

A transmissão vertical, ou disseminação de uma mãe infectada para sua prole, foi identificada como um fator de risco para a prevalência de infecção por Mhyo na idade de desmame (SIBILA et al., 2008). Apesar da maior parte das infecções ocorrerem nas fases de maternidade e creche, os quadros clínicos da PE se apresentam nas fases de crescimento e terminação, momento em que as lesões pulmonares e os prejuízos são mais evidentes (SIBILA et al., 2009).

Sendo assim, as fêmeas de primeira paridade têm uma importância especial na manutenção e transmissão do agente nas granjas, pois muitas das vezes as leitoas de reposição são adquiridas de granjas multiplicadoras negativas, e introduzidas em granjas positivas se configurando como novos hospedeiros suscetíveis (TAKEUTI et al., 2017; MAES et al., 2018). São necessárias práticas de manejo para que esta nova fêmea seja introduzida no rebanho, se infecte e soroconverta antes do parto, para que a mesma não esteja com uma infecção ativa na maternidade e contamine sua prole. A taxa de infecção pode se agravar em situações em que ocorre a mistura de lotes de creche de múltiplas origens, potencializando a transmissão de diferentes cepas de Mhyo e de patógenos secundários entre os animais (TAKEUTI; BARCELLOS, 2017).

Roos et al. (2016) estudaram a taxa de transmissão do agente em uma infecção experimental entre animais positivos e indivíduos suscetíveis, seu resultado demonstrou que a

taxa de transmissão estimada de Mhyo foi de 1,28 suínos/semana. Apesar de baixa esta taxa de transmissão, a mesma é duradoura por um longo período (PIETERS et al., 2009).

Sendo assim, os estudos de Pieters et al. (2009) e Roos et al. (2016) corroboram que o Mhyo apresenta baixa taxa de transmissão, ela é duradoura em decorrência da alta persistência no trato respiratório. Estas informações demonstram que o número de animais positivos em um lote é determinante para um maior ou menor desafio nas granjas.

2.3. Diagnóstico

A técnica “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção é o isolamento do agente, todavia este método é laborioso, e na maioria das vezes o meio de cultura pode ser contaminado por outras espécies de *Mycoplasma* (MAES et al., 1996; MAROIS et al., 2007), o que torna o isolamento inviável no diagnóstico de rotina.

A dificuldade em cultivar Mhyo levou ao desenvolvimento de outros testes de diagnóstico, como sorologia (ELISA indireto), sendo este um teste indireto, imunofluorescência (FA), reação em cadeia da polimerase (PCR), imuno-histoquímica (IHC), hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e inspeção post-mortem. Estas são as técnicas usadas para verificar se existe o envolvimento de Mhyo nas infecções respiratórias. No entanto, o isolamento da bactéria ainda é necessário para realizar estudos mais precisos (MAROIS et al., 2007; SIBILA et al., 2009).

Para o uso de técnicas moleculares como PCR ou qPCR, há de se levar em conta que o alvo dessas técnicas é o genoma bacteriano, não garantindo viabilidade do agente, o que não permite afirmar se tratar de uma infecção ativa. No caso de Mhyo, que se adere ao epitélio mucociliar do trato respiratório, lavados traqueobrônquico (LTB) podem ser usados para detecção do DNA do agente, tanto em animais vivos como mortos (KWON et al., 2002; JORGE et al., 2014). A detecção e quantificação de DNA de Mhyo em tecidos pulmonares também pode ser determinada por qPCR, assim como em swabs nasais e laringeais (WOOLLEY et al., 2012; SALLING e CHRISTENSEN, 2016; SIBILA et al., 2009).

Já em técnicas sorológicas como ELISA, seu resultado é limitado quando o objetivo é detectar infecções ativas do agente, pois o ensaio não consegue distinguir anticorpos de infecções naturais, de anticorpos vacinais, por outro lado, as técnicas como imunofluorescência (FA), imuno-histoquímica (IHC), hibridização *in situ* fluorescente (FISH) que possuem capacidade de detecção direta do agente e alta especificidade, entretanto possuem sensibilidade limitada (MAES et al., 2008).

O aparecimento progressivo de tosse crônica durante o alojamento de um lote de suínos é um importante sinal clínico que pode indicar presença de Mhyo no rebanho (SIBILA et al., 2009). Na busca por um diagnóstico presuntivo, deve-se complementar as informações inerentes aos sinais clínicos com as lesões pulmonares e padrões de lesões encontrados no exame histopatológico.

O processo de infecção e seu tropismo pelo epitélio do trato respiratório inferior afeta as sensibilidades diagnósticas associadas ao local de amostragem e estágio da infecção. Um conhecimento profundo das ferramentas disponíveis para a rotina de testes de diagnóstico, juntamente com uma compreensão detalhada da dinâmica da infecção, é essencial para otimizar as estratégias de amostragem e fornecer confiança no processo de diagnóstico (GARCIA-MORANTE et al., 2022).

2.4. Patogenia e fatores de virulência

Independentemente de sua inerente simplicidade, sendo uma pequena bactéria sem parede celular com genoma reduzido, Mhyo utiliza vários mecanismos de patogenicidade, alguns dos quais não são totalmente compreendidos (LEAL ZIMMER et al., 2020).

A ocorrência das lesões no epitélio pulmonar dos suínos acontece em decorrência das interações entre o Mhyo e o hospedeiro. Esta interação é de grande complexidade e objetivo de muitos estudos que visam preencher as lacunas ainda presentes sobre mecanismos moleculares e celulares relacionados à adesão celular, secreção, sinalização, citotoxicidade, apoptose e imunomodulação (LEAL ZIMMER et al., 2020). Esta compreensão é importante para que possamos assim produzir testes diagnósticos mais precisos, tratamentos mais assertivos e melhores vacinas.

Dentre os fatores externos que contribuem para o agravamento da PES estão as condições de manejo e alojamento, e também pode depender da virulência da cepa infectante, uma vez que grandes diferenças na virulência foram mostradas em isolados de campo (MEYNS et al., 2007; LEAL ZIMMER et al., 2020).

Um estudo conduzido por (VICCA et al., 2003) demonstrou que existem variações na virulência entre diferentes isolados de campo de Mhyo. Os autores estabeleceram uma classificação de baixa, média e alta patogenicidade baseada na apresentação dos sinais clínicos e lesões de PES. O estudo demonstrou que os isolados altamente virulentos tinham capacidade de induzir lesões e processos inflamatórios mais cedo após a inoculação, em comparação com o isolado de baixa virulência.

É notória a existência de cepas de diferentes graus de patogenicidade, porém em virtude da falta de uma métrica universalmente padronizada deste conceito devido ao fato de os trabalhos utilizarem diferentes técnicas moleculares e histopatológicas, e as diferentes condições ambientais dos estudos, se torna difícil a comparação dos diferentes isolados conhecidos.

Apesar das diferenças ambientais de crescimento *in vitro* e *in vivo*, Meyns et al. (2007) estudaram a diferença entre isolados de alta e baixa virulência associados a uma rápida multiplicação *in vitro*, concluindo que os isolados de alta virulência têm maior capacidade de multiplicação, conseqüentemente uma maior capacidade de crescimento nos pulmões induzindo um processo inflamatório mais grave.

Estima-se que de 20 a 30% dos genes presentes no Mhyo são responsáveis por expressarem proteínas de superfície, porém muitas delas ainda tem sua função desconhecida (FELDE et al., 2018a). Algumas importantes proteínas expressas em sua superfície são as adesinas, estas são apontadas como um importante fator de virulência.

A colonização do epitélio ciliado respiratório pelo Mhyo depende especificamente da expressão de duas famílias de adesinas funcionalmente redundantes que são parálogas P97 e P102 (SIQUEIRA et al., 2014). Ao menos 35 proteínas foram associadas à adesão celular, sendo elas várias relacionadas às famílias P97/P102 (LEAL ZIMMER et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2014; RAYMOND & DJORDJEVIC, 2015). A P102 apresenta ter capacidade de sequestrar plasminogênio e fibronectina para sua superfície, tendo papel importante na virulência (BOGEMA et al., 2012). Já a P97 foi a primeira adesina caracterizada na superfície do Mhyo (ZHANG; YOUNG; ROSS, 1995), tendo como uma de suas funções o processo de adesão aos cílios.

Beuckelaere et al. (2022) conduziram um estudo de comparação transcriptômica de tecidos de lesão pulmonar de suínos infectados com a cepa 98 com tecido pulmonar de animais não infectados, e o mesmo estudo identificou 424 genes diferencialmente expressos. Esses genes faziam parte das seguintes principais vias do sistema imunológico: sinalização de interleucinas, regulação de receptores *Toll-like* e ativação de C3 e C5 no sistema complemento. O mesmo também comparou o transcriptoma bacteriano *in vivo* com o transcriptoma da cepa 98 cultivada *in vitro* e foi possível identificar 22 genes regulados positivamente e 30 negativamente. Este estudo demonstra a plasticidade do Mhyo em regular a expressão de seus genes em virtude do meio em que está inserido.

2.5. Variabilidade Genética

Com o avanço da biologia molecular foi possível caracterizar que no genoma do Mhyo a sequência de algumas adesinas tem várias repetições, dentre elas a P97 e a P146 são as mais comumente avaliadas. O aumento do número de repetições para cada uma destas adesinas vai caracterizar uma variante diferente de Mhyo (DOS SANTOS et al., 2015). Uma hipótese importante é de que o maior número de repetições se configura em maior capacidade de aderência, conseqüentemente maior virulência entre isolados (BETLACH et al., 2019).

A nível genômico, foi demonstrada alta heterogeneidade entre isolados de Mhyo por todo o mundo, usando várias técnicas de tipagem, como DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (ARTIUSHIN E MINION, 1996), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (KOKOTOVIC et al., 1999) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (STAKENBORG et al., 2005; SIBILA et al., 2009). A análise do número variável de múltiplos loci de repetições em tandem (MLVA) e a PCR combinada com polimorfismo de comprimento de fragmentos restritos (PCR-RFLP). Um ensaio de MLVA foi descrito como uma ferramenta para diferenciar cepas de Mhyo em amostras do trato respiratório sem cultivo prévio (VRANCKX et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2015; CHARLEBOIS et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, existem variantes de Mhyo em todos os países onde a suinocultura tem relevância econômica Takeuti et al. (2017). Dos Santos. (2015) e colaboradores avaliaram cepas de Mhyo circulante nos Estados Unidos da América (EUA), Brasil, México e Espanha por MLVA com base no número de repetições em tandem em duas adesinas P97 e P146 de um total de 355 amostras. Este trabalho identificou um grande número de tipos de MLVA ($n = 139$), sugerindo que múltiplas variantes de Mhyo estão circulando em rebanhos nestes países. O locus P97 tinha 17 tipos diferentes com 2 a 18 repetições. O locus P146 apresentou maior heterogeneidade, com 34 tipos diferentes, variando de 7 a 48 repetições. Tipos de MLVA que apresentaram mais de 30 repetições em P146 foram encontrados na Espanha e no Brasil, enquanto repetições menores foram observadas nos EUA e no México.

Takeuti et al. (2017) avaliaram presença de variantes no Brasil por MLVA em leitões de quatro granjas multiplicadoras positivas. Podem ser observadas várias variantes com mais de 40 repetições da P146. Na multiplicadora A foram encontradas seis variantes, B onze variantes e C duas variantes. Totalizando 17 variantes nas 4 multiplicadoras.

A análise de diversidade por MLVA também foi executada utilizando amostras da Argentina, Hungria, Canada, China dentre outros países (SOSA et al., 2019; FELDE et al.,

2018a; CHARLEBOIS et al., 2014; WU et al., 2022) . Em todos os trabalhos citados foram encontradas variações significativas de diversidade genética entre as amostras analisadas.

2.6. Sinais clínicos e lesões

As infecções por Mhyo se caracterizam clinicamente por uma tosse seca não produtiva, intermitente e intensidade variável (SIBILA et al., 2009) . Em um cenário endêmico, o curso da doença implica alta morbidade, mas baixa mortalidade (THACKER & MINION, 2010). A fase mais comum do início do acometimento clínico se dá na fase de crescimento por volta das 8 a 16 semanas de idade (RYCROFT, 2020).

Em infecções experimentais, o início do aparecimento da tosse se dá entre 10 a 16 dias pós inoculação do agente, podendo se estender por até 12 semanas (KOBISCH & FRIIS, 1996; MAES et al., 2008).

A tosse é consequência direta das lesões pulmonares observadas nos animais acometidos, que consistem em áreas consolidadas de cor vermelha localizadas nos lobos apicais e médios em sua porção crânio ventral e, eventualmente em casos mais graves, a parte cranial dos lobos diafragmáticos (GARCÍA-MORANTE et al., 2015; WOOLLEY et al., 2012).

As infecções por Mhyo são divididas em duas fases, ou seja, fase aguda e crônica. Esta classificação é baseada na apresentação dos sinais clínicos. No entanto, em alguns casos a doença pode ser considerada subclínica, pois não há sinais observados, apesar dos animais serem positivos ao agente. Por outro lado, definir os diferentes períodos de infecção pelo Mhyo é fundamental para traçar estratégias do controle da doença (PIETERS et al., 2020).

Após a infecção, o Mhyo inicia sua multiplicação se aderindo aos cílios através de suas adesinas, causando assim a ativação do sistema imune, levando à diapedese de macrófagos e linfócitos nas áreas perivasculares, peribronquiais e septo alveolar, e consequentemente estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este processo causa a destruição do aparato mucociliar do epitélio respiratório ciliostase (WOOLLEY et al., 2012; BUSTAMANTE-MARIN; OSTROWSKI, 2017). O aparato mucociliar age aprisionando os patógenos respiratórios inalados e juntamente com os batimento coordenados dos cílios, expulsa parte da carga bacteriana para fora das vias aéreas (LEAL ZIMMER et al., 2020). Uma vez instalada a infecção pelo Mhyo, a barreira pode ser comprometida, o que torna o hospedeiro suscetível a potenciais infecções secundárias. As lesões pulmonares induzidas pelo

Mhyo indicam que o hospedeiro suíno está produzindo uma resposta imune à infecção, mas essa resposta não está removendo o patógeno bacteriano rapidamente.

2.7. Resposta imune

Os fatores imunológicos dos suínos que contribuem para a PES incluem moléculas e processos que medeiam as defesas inatas e adaptativas contra o patógeno, mas também causam danos aos tecidos decorrentes da resposta inflamatória exacerbada gerada (LEAL ZIMMER et al., 2020).

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa absolutamente essencial para prevenir ou controlar a replicação precoce do patógeno antes da geração da resposta imune adaptativa (SUMMERFIELD, 2020).

Durante a infecção, ocorre uma interação de Mhyo com o sistema imune inato (macrófagos e neutrófilos) (CHARLEBOIS et al., 2014), logo após a invasão do agente no hospedeiro, ocorre a estimulação de citocinas pró-inflamatórias, que são responsáveis pelo surgimento das lesões pulmonares, com características linfoproliferativas (VICENTE et al., 2013), sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões (SIMIONATTO et al., 2013). A produção de citocinas pró-inflamatórias têm sido associada ao desenvolvimento de lesões características da PES. Aumento nos níveis de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α têm sido relatado em suínos infectados por Mhyo (OKAMBA et al., 2010; JORGE et al., 2014; MUNETA et al., 2008).

Evidências atuais indicam que a produção de citocinas anti-inflamatórias, especialmente IL-10, podem minimizar a lesão pulmonar em decorrência da resposta inflamatória (HAKIMI et al., 2014; JORGE, et al., 2014).

Estudos apontam a capacidade de diferentes espécies de *Mycoplasma* estimularem a expressão de citocinas anti-inflamatórias, em especial IL-10 (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999). Em se tratando do Mhyo, Muneta et al. (2008) observaram o aumento de expressão de IL-10 em suínos com 24 dias de infecção, já Shen et al. (2017) observaram tal fato *in vitro* em cultivo de células dendríticas de suínos desafiadas com a cepa 168 após 24 horas. Este mecanismo pode auxiliar na evasão do sistema imune prolongando a infecção.

Uma importante barreira do sistema imune inato dos suínos são os macrófagos alveolares, sendo estes responsáveis pelos primeiros contatos com antígenos presentes no sistema respiratório. Deeney et al. (2019) conduziram estudo a fim de avaliar a capacidade do

Mhyo de evasão dos macrófagos alveolares suínos. Foi considerado provado que Mhyo pode escapar dos mecanismos de depuração de macrófagos alveolares (DEENEY et al., 2019), tal evidência já foi observada em outras espécies de *Mycoplasmas*. Isto pode explicar em parte porque Mhyo não é eliminado rapidamente pelo sistema imunológico respiratório. Adicionalmente, já foram relatados estudos que demonstram a capacidade do Mhyo em modular a resposta imune do hospedeiro. Bai et al. (2013) demonstraram *in vitro* que lipídeos associados à membrana plasmática (LAMP) induzem apoptose da linhagem celular de macrófagos alveolares suínos através do aumento da produção de óxido nítrico e ativação da caspase-3. Os estudos de Ni et al. (2015) também corroboram este resultado.

Outro componente importante do sistema imune inato é o sistema complemento, um dos seus componentes regulatórios é o fator H, sendo um regulador negativo do sistema complemento, que se liga às células do hospedeiro para evitar a ativação inesperada do complemento. Yu et al. (2020) relataram pela primeira vez que o Mhyo pode capturar o fator H em sua superfície de tal forma que se apresente como um tecido do hospedeiro e assim escapar do ataque do complemento (YU et al., 2020).

A diminuição da deposição de C3 na superfície Mhyo bloqueia a ativação adicional do complemento. De fato, a ligação do fator H ocorre de forma multifatorial, o fator H não é apenas explorado pelo Mhyo por meio de sua atividade reguladora para ajudar os micoplasmas a escaparem da morte pelo sistema complemento, mas também aumentar parcialmente a sua adesão as células epiteliais da traqueia suína (YU et al., 2020).

Alguns estudos sugerem a existência de relação entre a capacidade de formação de biofilme e virulência das bactérias (SOLTANI et al., 2018). Os biofilmes são comunidades bacterianas densas associadas à superfície e protegem as bactérias dos efeitos letais da imunidade do hospedeiro e agentes antibacterianos. No entanto, pouco tem sido relatado sobre a relação entre biofilmes e diferenças de virulência entre cepas de Mhyo (WU et al., 2022).

Com o objetivo de avaliar esta correlação Wu et al. (2022), compararam a capacidade de formar biofilme e sua correlação com a virulência entre as cepas (168, 168 L, NJ, XLW-2, RM48, J e LH). As cepas altamente virulentas 168, NJ e LH possuíam uma forte capacidade de formar biofilmes, enquanto as cepas atenuadas J, 168 L, XLW-2 e RM48 mostraram uma capacidade relativamente fraca de formar biofilmes, assim se sugere que as diferenças na virulência das cepas podem ser correlacionadas com sua capacidade de formação de biofilme (WU et al., 2022).

Enfim, vários são os mecanismos descritos e estudados que configuram ao Mhyo, esta enorme plasticidade de ter a capacidade de colonizar a trato respiratório e permanecer por longos períodos sendo excretado ativamente por seu hospedeiro.

2.8. Prevenção e controle

O controle e a prevenção da pneumonia enzoótica baseiam-se na otimização das condições de gestão, vacinação e tratamento com antibióticos (LEAL ZIMMER et al., 2020).

A alta prevalência de granjas positivas para Mhyo, e a limitada utilização dos programas de erradicação desta bactéria na suinocultura brasileira fazem com que seja necessário estabelecer medidas de prevenção e controle que sejam eficazes para que a ocorrência da PES seja economicamente aceitável (TAKEUTI E BARCELLOS, 2017).

Os antibióticos mais utilizados para o controle da infecção do *Mycoplasma* são os macrolídeos e tetraciclina, lincosamidas, fluorquinolonas, pleuromutilinas, fenicóis e aminoglicosídeos (FELDEB et al., 2018).

Devido à ausência da parede celular, micoplasmas não são afetados pelos β -lactâmicos, glicopeptídeos e fosfomicinas que têm como alvo a síntese da parede celular. Os *Mycoplasmas* são naturalmente resistentes à rifamicina, polimixina, sulfonamidas e quinolonas de primeira geração. A resistência à rifamicina deve-se provavelmente a uma mutação no gene *rpoB* da subunidade de RNA polimerase β , que impede que o antibiótico atue no alvo. Já a resistência a polimixinas e sulfonamidas/trimetoprim é devida a ausência de lipopolissacarídeos e ácido fólico, que são os alvos iniciais destes antimicrobianos (GAUTIER-BOUCHARDON, 2018).

A vacinação é considerada a medida relativamente mais eficaz para o controle da doença (CHAE, 2016). As vacinas contra Mhyo são utilizadas em todo o mundo e consistem principalmente em preparações de células inativadas (bacterinas) conjugadas com adjuvante sendo administradas por via intramuscular (MAES et al., 2008).

A imunização com bacterinas não confere proteção total contra a doença e animais vacinados podem ser infectados (VILLARREAL et al., 2012). Apesar dos efeitos relativamente positivos, estas bacterinas comerciais fornecem apenas uma resposta imune que não impede a colonização do agente em células epiteliais (THACKER MINION, 2010), favorecendo assim o surgimento da doença subclínica e o estabelecimento de suínos portadores, os quais são agentes potencializadores de transmissão (GALLI et al., 2012). Deve

ser considerado que as vacinas comerciais são baseadas principalmente na cepa J, que foi isolada no Reino Unido Friis 1957 (SIMIONATTO et al., 2013).

Até 2019 existiam 26 vacinas aprovadas e comercialmente disponíveis em todo o mundo para prevenir a infecção por Mhyo (TAO et al., 2019). Em animais naturalmente infectados são observadas frequentemente falhas na vacinação, associadas à falta de proteção cruzada entre cepas encontradas em vacinas e cepas de campo (SIMIONATTO et al., 2013).

Iniciativas para o desenvolvimento de novas vacinas que possam oferecer maior proteção contra o Mhyo já vêm sendo também realizadas em diferentes plataformas: vetores virais, vacina de DNA, expressão recombinante em *E. coli* (OKAMBA et al., 2010; GALLI et al., 2012; SIMIONATTO et al., 2012; JORGE et al., 2014).

Estudos têm demonstrado o potencial de diversas proteínas recombinantes, que foram avaliadas em várias formulações e formas de administração, como alvos vacinais, das quais alguns foram testados individualmente (GALLI et al., 2012; SIMIONATTO et al., 2012; VILLARREAL et al., 2012; MARCHIORO et al., 2013; JORGE et al., 2014). A maioria dos antígenos foram testados apenas em modelo murino e demonstram ser um bom potencial candidato vacinal. Embora o conhecimento sobre o sistema imune de camundongos não possa ser totalmente extrapolado para suínos, ainda são escassos os estudos em suínos desafiados em condições experimentais e suínos naturalmente infectados devido ao alto custo das pesquisas (CHAE, 2016), fato este que tem limitado o avanço das plataformas vacinais.

2.9. Isolados caracterizados

Até o presente momento podem ser encontrados 26 genomas depositados no NCBI completamente sequenciados como pode ser observado na figura 1 e tabela 1, entre eles os isolados deste trabalho (UFV01 e UFV02). Porém, muitos deles não foram completamente estudados, tendo poucas informações acerca de sua patogenicidade.

O primeiro isolado obtido foi o J por Friis em 1957 no Reino Unido (KOBISCH & FRIIS, 1996) e teve seu genoma depositado em 2005 (VASCONCELOS et al., 2005).

Os isolados comprovadamente patogênicos mais estudados até o momento são 232 (EUA), 7422 e 7448 (Brasil) e 168 (China) (MINION et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2005; LIU et al., 2011). Existem os isolados 11 (Holanda), F7.2C (Suíça), KM014 (Coreia do Sul), LE (China), TB1 (China) e ES2-L (China) (KAMMINGA et al., 2017; TRUEEB et al., 2019; HAN et al., 2017; XIE et al., 2021 e QIU et al., 2019) que também tiveram sua patogenicidade comprovada, porém seus dados são escassos. A cepa 168

é uma cepa patogênica prevalente na China, foi isolada em 1974 (LIU et al., 2011). O genoma completo da cepa 168 consiste em 925.576 pb com 28,46% de conteúdo G+C (LIU et al., 2011). Já a cepa 168 L foi derivada da cepa 168 por > 300 passagens contínuas *in vitro* com objetivo de torna-la não patogênica. O genoma de 168-L tem um conteúdo altamente semelhante ao de 168, mas é 4.483 pb menor porque há 60 inserções e 43 deleções em 168-L. (LIU et al., 2013). Li et al. (2019) realizaram uma comparação proteômica em larga escala entre a cepa 168 virulenta e a 168L atenuada e identificou 489 proteínas no total, 70 das quais apresentando diferenças significativas no nível de expressão entre as duas cepas. Notavelmente, as proteínas que participam do metabolismo do fosfato de inositol foram significativamente reguladas negativamente na cepa virulenta, enquanto algumas proteínas envolvidas no metabolismo de nucleosídeos foram reguladas positivamente.

Os demais isolados MHP650, MHP653, MHP679, MHP682, MHP691, MHP694, MHP696, MHP699 e MHP709 foram isolados na França e depositados no NCBI no ano de 2020. Já o isolado 98 tem origem na Holanda e depositado em 2020. O ES2 foi isolado na China e depositados em 2019. Por fim, o NCTC10127 tem origem no Reino Unido e depositado no ano de 2019. Os isolados descritos acima até o momento não foram apresentados estudos acerca de sua patogenicidade.

No Brasil até o presente momento temos apenas completamente sequenciados e depositados apenas os isolados 7422 e 7448, e os isolados UFV01 e UFV02 (propostos neste estudo). Neste sentido, a importância no desenvolvimento de pesquisas com cepas nacionais a fim de entender as particularidades deste patógeno em território nacional, como o entendimento de seu perfil genético e como as diferentes cepas se comportam quanto a seu fenótipo.

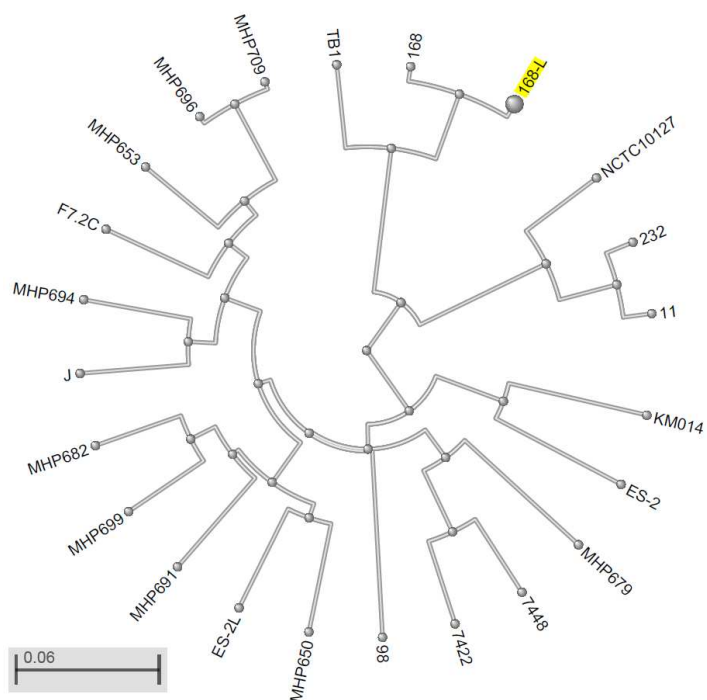


Figura 1: Dendrograma da última atualização do Genomic Blast de 23 isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae* depositados até o janeiro de 2023 (NCBI). OBS: Neste alinhamento não contem os isolados UFV01, UFV02 e LE.

Tabela 1: 26 genomas sequenciados e depositados na base de dados GenBank.

Nome	Número acesso GenBank	Tamanho genoma (Mb)	% G + C	CDS	Acesso aberto GenBank	Ano isolamento	Pais de origem	Virulência
UFV02	PRJNA542605	0,959419	28,5	709	2022	2017	Brasil	+*
UFV01	PRJNA542605	0,909816	28,40	674	2022	2017	Brasil	+*
TB1	PRJNA378902	0,909064	28,7	707	2017	2016	China	+
NCTC10127	PRJEB6403	0,960532	28,53	738	2019	2016	Suíça	ND
MHP709	PRJNA478906	0,875793	28,6	629	2020	2016	França	ND
MHP699	PRJNA478906	0,918878	28,5	641	2020	2016	França	ND
MHP696	PRJNA478906	0,874552	28,6	630	2020	2016	França	ND
MHP694	PRJNA478906	0,867508	28,6	621	2020	2016	França	ND
MHP691	PRJNA478906	0,897976	28,5	646	2020	2016	França	ND
MHP682	PRJNA478906	0,905968	28,6	646	2020	2016	França	ND
MHP679	PRJNA478906	0,901315	28,6	665	2020	2016	França	ND
MHP653	PRJNA478906	0,892502	28,5	643	2020	2016	França	ND
MHP650	PRJNA478906	0,903416	28,6	654	2020	2016	França	ND
LE	PRJNA741719	0,920587	28,5	693	2022	2012	China	ND
KM014	PRJNA396462	0,964503	28,40	900	2017	2014	Coreia Sul	+
J	PRJNA10675	0,897405	28,5	672	2005	1957	Reino Unido	-
F7.2C	PRJNA506155	0,894983	28,6	676	2019	2000	Bélgica	+
ES-2L	PRJNA576551	0,918900	28,5	686	2020	2019	China	+
ES-2	PRJNA530402	0,956514	28,40	718	2019	2017	China	ND
98	PRJNA593525	0,880620	28,6	635	2020	2014	Holanda	ND
7448	PRJNA10639	0,920079	28,5	689	2005	2005	Brasil	+
7422	PRJNA47327	0,898495	28,5	673	2013	2013	Brasil	+
232	PRJNA13120	0,892758	28,6	674	2004	2004	USA	+
168-L	PRJNA76853	0,921093	28,5	697	2013	1974	China	-
168	PRJNA53881	0,925576	28,5	694	2010	1974	China	+
11	PRJNA378403	0,898117	28,7	670	2017	2012	Holanda	+

Patogênica (+); não patogênica (-); não descrita (ND).

2.1.1. Estudos experimentais

Um dos principais objetivos do modelo de infecção experimental de Mhyo em suínos é de estudar a doença clínica caracterizada como pneumonia enzoótica (GARCIA-MORANTE et al., 2017b). Neste sentido, é importante se ter um modelo de infecção padronizado para condução de estudos de patogênese da infecção, bem como para avaliar a eficácia de antibióticos e vacinas (GARCIA-MORANTE et al., 2016). Apesar de muitos estudos terem sido conduzidos ao longo do tempo, ainda não existem protocolos padronizados e validados para maximizar a chance de sucesso da realização da infecção.

Garcia-Morante et al. (2017b) compilaram 85 estudos de infecção experimental em modelo suíno em sua revisão sistemática totalizando um total de 261 unidades experimentais. Os resultados indicaram que os fatores mais importantes para explicar a variabilidade observada na pontuação das lesões pulmonares, ou seja o sucesso da infecção são: (1) duração do estudo, (2) patogenicidade da cepa, (3) idade na inoculação, (4) via de inoculação, (5) coinfeção e (6) origem animal. Na maior parte dos estudos foram utilizados suínos livres, a idade média na qual os animais foram desafiados foi de 6 semanas de idade por via intratraqueal com inóculo na concentração média de 10^7 CCU (Color Change Unit) por animal, e também foi observado que a média referente ao desafio durou 6 semanas. Adicionalmente, em 25% dos estudos foram introduzidos agentes secundários (bacterianos ou virais) e as cepas utilizadas foram muito variáveis, porém alguns estudos demonstraram a utilização de cepas comuns tais como 232 (USA); BQI14 (França); 116 (França); e E-1 (Japão). Os resultados obtidos com os parâmetros supracitados foram de que 72% dos animais por unidade experimental desenvolveram a doença clínica, os quais apresentaram em média 10% de lesão nos pulmões. Um dado que chama a atenção é de que 30 unidades experimentais (11,5%) não obtiveram sucesso em reproduzir a infecção, reforçando a dificuldade de reproduzir a infecção com este patógeno. O maior potencial de sucesso obtido para inoculações em suínos com até de 3,5 semanas de idade pode ser explicado pelo fato de que alguns mecanismos da imunidade inata e adquirida são menos desenvolvidos ao nascimento e amadurecem com a idade.

Para realização da inoculação, diferentes rotas de infecção artificial são descritas: aerossol, intratraqueal, e intranasal (CZAJA et al., 2002; MAROIS et al., 2009; GARCIA-MORANTE et al., 2016; WOOLLEY et al., 2012; MAROIS et al., 2007). Comparações entre os modelos de desafio usando diferentes rotas de inoculação são escassos na literatura.

Um estudo conduzido por (GARCIA-MORANTE et al., 2016) comparou o sucesso das 3 técnicas utilizando suínos SPF com 6 semanas de idade contendo 8 animais por grupo e o controle negativo 6, totalizando 30 animais. O período de infecção teve duração de 28 dias. A doença clínica foi observada em todos os grupos inoculados, mas o grupo inoculado de forma intratraqueal apresentou número maior de animais positivos, maior escore de lesão pulmonar, maior nível de citocinas pró-inflamatórias e maiores níveis de anticorpos IgA específicos no lavado traqueobrônquico (LTB). Adicionalmente, os animais inoculados por essa via apresentaram maior taxa de positividade em swab laríngeo. Os resultados sugerem que a via endotraqueal é a mais eficaz para induzir a pneumonia enzoótica em suínos desafiados experimentalmente com Mhyo.

A técnica por aerossol e intranasal tem a vantagem em detrimento da endotraqueal por muitas das vezes não ser necessária a sedação dos animais e por mais se aproximar do processo de infecção natural de campo, porém é relatado menor taxa de sucesso. Por sua vez, a endotraqueal alcança maiores taxas de sucesso na reprodução da doença, pois se administra maior volume inóculo atingindo maiores doses infectantes em curto espaço de tempo, o que promove uma colonização mais precoce do Mhyo e uma resposta imune contra a infecção, que ao final se reflete em uma maior incidência e maior gravidade da doença clínica (GARCIA-MORANTE et al., 2016). Por outro lado, este grande volume instilado diretamente nas vias aéreas induz uma forte resposta imune local, algo que não acontece em infecções reproduzidas através de aerossol, sendo esta mais próxima da dinâmica natural.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de infecção de isolados brasileiros de Mhyo utilizando modelo suíno através de infecção experimental. Determinar diferença de virulência das cepas de campo quanto a patogenicidade e resposta imune.

3.1. Objetivos Específicos

- Desafiar experimentalmente os suínos com os novos isolados de campo UFV 01 e UFV02.
- Quantificação por qPCR a carga bacteriana ao longo dos 35 dias de infecção.
- Quantificar a imunoglobulina IgG para avaliar a dinâmica de soroconversão ao longo dos 35 dias de infecção.
- Ao fim do ensaio realizar eutanásia dos animais para avaliar as lesões micro e macroscópicas causadas nos pulmões.
- Quantificação por qPCR a carga bacteriana presente nos lavados traqueobrônquicos e tecido pulmonar.
- Quantificar a imunoglobulina IgA presente nos lavados traqueobrônquicos usando o teste de ELISA.
- Quantificação de citocinas IL-10, TNF-alfa e IFN-gamma no soro através de testes de ELISA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Normas para experimentação animal

Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação às Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV norma 39/2021 (anexo1). Os procedimentos realizados estavam sob a supervisão do médico veterinário responsável Leonardo Teófilo Toledo CRMV/MG 23682.

4.2. Amostragem/ Seleção de suínos

Foram adquiridos 20 leitões Landrace x Large White com peso médio $7,585 \pm 0,591$, aproximadamente 23 dias de idade da empresa Agroceres PIC. A granja possui histórico de negatividade para o agente em questão desde a sua implantação.

A determinação do tamanho da amostra e a distribuição dos grupos foi determinada a partir de uma revisão de literatura dos principais trabalhos relacionados ao estudo proposto. Em virtude de ser um ensaio de infecção experimental de um patógeno que apresenta inúmeras particularidades acerca da sua biologia, e na qual a doença clínica não se reproduz com facilidade pelo fato deste patógeno não seguir os postulados de Koch, uma predição estatística em relação ao número de animais, os quais não venham a comprometer os possíveis resultados do estudo se torna inviável.

Sendo assim o estudo foi dividido em dois grupos-teste (n=8) cada, e um grupo controle negativo (n=4), totalizando assim 20 animais. Um grupo teste foi inoculado com o isolado UFV01, o segundo grupo foi inoculado com o isolado UFV02 e o controle negativo com meio Friis. Os animais foram mantidos em baias desinfectadas e isoladas do meio externo no infectório (figura 02) de grandes animais do DVT-UFV.

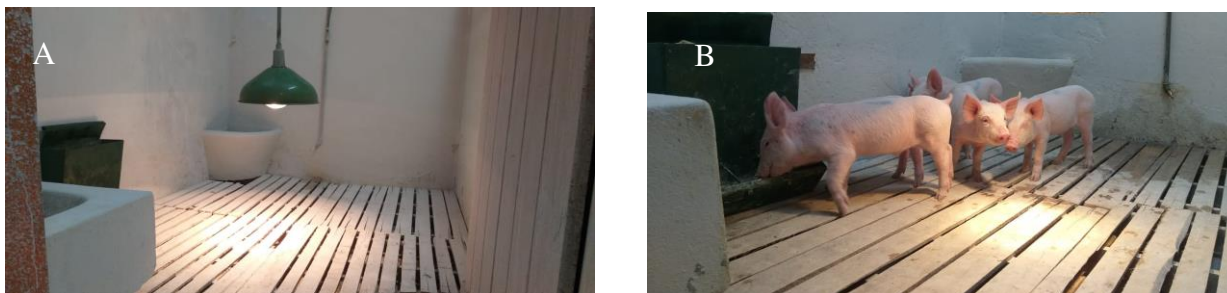


Figura 2: A - Baias onde foram alojados os animais, B – Suínos alojados na baia antes do desafio experimental (fotos de arquivo pessoal).

4.3. Monitoramento temperatura das instalações

As temperaturas máxima e mínima da instalação foram monitoradas diariamente durante o período de infecção (35 dias). As temperaturas registradas estão dentro da faixa de conforto térmico recomendada para a fase de média mínima de 22,3°C e média máxima de 26,95 °C (apêndice Figura S B).

4.4. Avaliação dos sinais clínicos

Diariamente após desafiados, os animais foram observados durante 40 minutos em momentos de repouso e agitação. Os eventos de tosse seca não produtiva foram avaliados e anotados por um único observador cego ao longo do estudo, os resultados foram plotados graficamente (SILVA et al., 2022).

4.5. Origem, cultivo e quantificação dos isolados

Os isolados foram obtidos através de coletas de pulmões com suspeita de pneumonia enzoótica de animais de abate provenientes de uma propriedade localizada no Vale do Piranga no estado de Minas gerais, Brasil (GONZAGA et al., 2019).

Os isolados foram cultivados em meio Friis 1x (líquido) e 2.8x (meio sólido), preparados de acordo com Cook et al. (2016). Eles foram reativados em meio líquido na proporção de 1:9 (inóculo congelado x meio). Os tubos de ensaio incubados a 37 °C foram observados diariamente até a mudança de cor. O crescimento bacteriano foi evidenciado pela alteração da cor do meio. Foram realizadas três passagens para reativar o isolado, após a quarta passagem o inóculo foi alíquotado em volumes individuais de 10 ml e congelado em freezer -80 até o momento da inoculação.

Foi realizada a quantificação dos isolados pela técnica de CCU (Color Changing Units) realizada conforme Calus et al. (2010). Para esta técnica, utilizou-se uma placa de 96 poços onde foram adicionados 180 µL de meio Friis 1x nos poços A, B e C (triplicata) e 20 µL do isolado na coluna 01 previamente descongelado. Nos poços seguintes realizaram-se 10 diluições seriadas. As placas foram seladas e incubadas a 37 °C por 14 dias.

Paralelamente foi realizado o cultivo dos isolado em meio friis sólido 2.8x para visualizar a morfologia das colônias (figura 3). Os isolados foram incubados em estufa a 37 °C conforme descrito por Cook et al. (2016). O crescimento nas placas foi observado diariamente em microscópio EVOS XL Core.

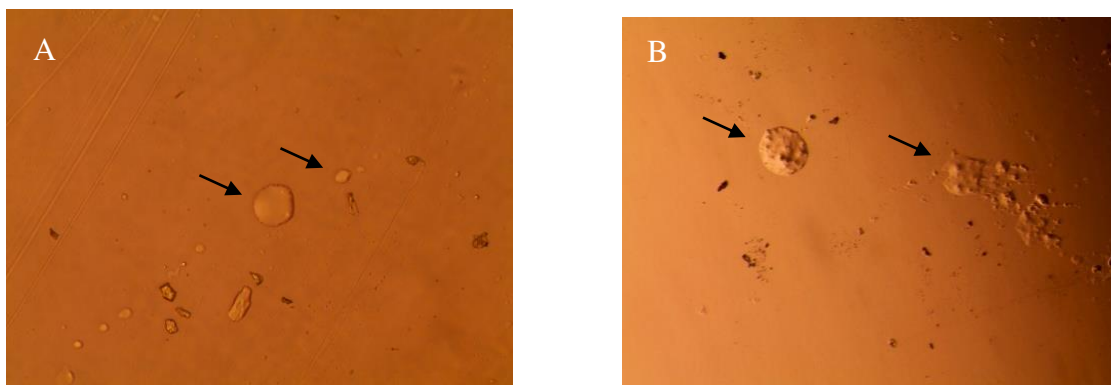


Figura 3: Colônias de *Mycoplasma hyopneumoniae*. A - Colônias de aspecto liso isolado UFV01 aumento 20x. B - Colônias rugosas isolado UFV02, aumento 10x. (EVOS XL Core).

4.6. Infecção experimental

Após a recepção dos animais, estes passaram por 12 dias de adaptação nas instalações. No momento de sua recepção foram coletados swabs nasais e amostras de sangue, com o objetivo de se assegurar o status de livre de infecção por *Mhy*. Todos os animais foram negativos tanto na qPCR para detecção do agente como para a presença de anticorpos anti-*Mhy* (IgG) no ELISA.

Após os 12 dias de aclimação, os animais dos grupos foram desafiados por via intratraqueal com 10 mL de inóculo contendo 1×10^6 CCU/mL. Os animais do grupo controle negativo foram inoculados apenas com meio Friis. Os animais foram inoculados aos 35 dias de idade.

Os animais foram sedados com medicamento pré-anestésico acepromazina na dose de 0,3mg/kg, seguido de cetamina 5mg/kg e xilazina 0,25mg/kg pela via endovenosa. Para indução anestésica foi utilizado propofol 5mg/kg. Após a indução anestésica, os suínos foram intubados com auxílio de um cateter endotraqueal e em seguida inoculados (Figura 4 A). Durante todo o procedimento os animais foram monitorados.

Nos dias d0 (recebimento animais), dpi 0 (dia pós inoculação), 7, 14, 21, 28 e 35, foram coletadas amostras de soro e swab laringeal para avaliar a curva de soro conversão e excreção do agente (Figura 4 B). No dpi 35 todos os animais foram eutanasiados.

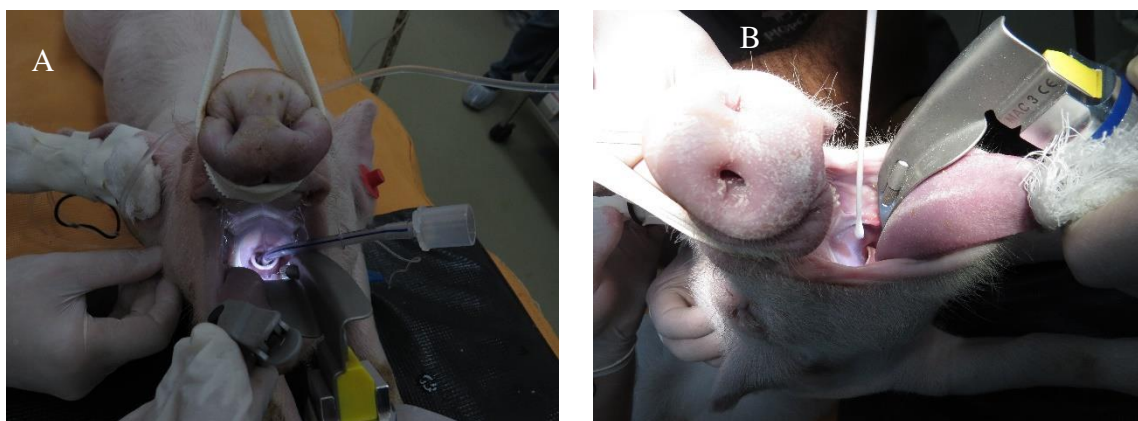


Figura 4: A - Procedimento de intubação para inoculação do isolados de *Mycoplasma hyopneumoniae*. B - Coleta de swab laringeal (Fotos de arquivo pessoal).

4.7. Clonagem para padronização da qPCR

A clonagem foi realizada a partir de uma amostra de DNA extraída do cultivo da cepa J em meio Friis. A bactéria foi submetida a PCR convencional utilizando o primer descrito por Fourour et al., (2018), com um amplicon de 150 pares de bases. A partir deste produto foi realizada a clonagem utilizando o kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher[®]) e transformado utilizando célula competente *E. coli* TOP10. Após a transformação, os clones transformantes foram plaqueados em meio LB sólido contendo ampicilina. Em seguida foram selecionadas 20 colônias isoladas, adicionadas em meio LB líquido para posterior análise por PCR convencional das colônias para seleção dos clones transformantes recombinantes.

Após a confirmação por PCR convencional, dois clones foram selecionados e multiplicados em meio LB líquido, em seguida, foi feita a extração utilizando o kit miniprep Fast-n-Easy Plasmid Mini-prep (Cellco[®]). Posteriormente, foram realizados ensaios de restrição utilizando enzimas de restrição e DNA plasmidial. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, com objetivo de realizar uma segunda confirmação do sucesso da clonagem.

A quantificação do DNA plasmidial foi realizada utilizando kit Qubit QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega[®]). A partir da quantificação do Qubit juntamente com o

tamanho do plasmídeo 3124pb (plasmídeo + incerto Mhyo), foi estimado o número de cópias utilizando o site <http://modra-stanice.cz/bio/DNAtoCopy.html>.

A curva foi diluída de forma seriada de 10^7 até 10^2 cópias. A eficiência da reação de qPCR variou entre 101,73 / 98.62 %; R^2 de 1 até 0.9931 e slope de -3.281 até -3.355 (apêndice Tabela S A e Figura S A).

4.8. Extração de DNA

Para extração de DNA das amostras de swab laringeal, tecido pulmonar, swab de tecido pulmonar e lavado traqueobrônquico foi utilizada a metodologia adaptada descrita por Kuramae-Izioka, (1997). Para extração do tecido foi utilizado 0,5g de tecido, para o swab e lavado traqueobrônquico foi utilizado volume aproximado de 500 μ L de amostra. Em seguida foi adicionado às amostras 600 μ L de tampão de lise (Lysis Buffer, promega), agitado em vórtex e incubado em banho seco por 65°C por 45 minutos (vórtex a cada 15 minutos). Terminada a incubação, acrescentou-se 250 μ L de Acetato de potássio 5M, e foi realizada nova incubação em gelo por 30 minutos, agitando-se por inversão a cada 15 minutos. Em seguida adicionou-se 500 μ L de clorofórmio seguido de agitação em vórtex. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 10°C por 10 minutos a $13.000 \times g$.

Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e passado para outro tubo, onde se acrescentou-se 1000 μ L de solução de etanol absoluto e foi armazenada a -20°C overnight (16 horas) para precipitação do DNA. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10°C por 20 minutos a $13.000 \times g$ e em seguida descartou-se o sobrenadante, acrescentando-se 1mL de solução de álcool 70%. Agitou-se então suavemente o tubo para ressuspender o precipitado formado no fundo do micro tubo. Procedeu-se nova centrifugação (10°C por 20 minutos a $13.000 \times g$). Ao final, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dessecado. Terminada a secagem acrescentaram-se 50 μ L de tampão de eluição (Promega). A quantificação da concentração do DNA extraído foi por espectrofotometria (Nanodrop®, Thermo Fisher- EUA). Por fim, as amostras de DNA foram estocadas a -80°C até o uso.

4.9. PCR Endógeno

Como controles endógenos das extrações de DNA das amostras, foi utilizado primer desenhado por (ASSAO et al., 2019) que amplifica uma região de 107 pb do gene ribossômico 18S (GenBank:AY265350.1) de suínos: *sense* 5'-GCCTCGAAAGAGTCCTGTATTG-3' e *anti-sense* 5'-CTGAGAAACGGCTACACATC-

3'. A PCR foi realizada usando Go Taq Green Master Mix 2x (Promega) nas seguintes condições: 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 40s e uma extensão final a 72 ° C por 7 min.

O produto do PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5%, em tampão Tris Borato EDTA 0,5X, adicionado de corante intercalante UniSafe (Uniscience®) e ao final, o produto da eletroforese foi visualizado sob luz ultravioleta.

4.1.1. Detecção de cópias de DNA de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Para a detecção e quantificação do genoma de Mhyo das amostras foi seguido o protocolo descrito por (ALMEIDA et al., 2020). A reação se deu utilizando com par de primer e sonda publicada por (FOUOUR et al., 2018) *sense*: 5' TAAGGGTCAAAGTCAAAGTC-3', *anti-sense*: 5'- AAATTTAAAAGCTGTTCAAATGC-3' e Sonda de hidrólise 5'- FAM-AACCAGTTTCCACTTCATCGCC-§BHQ2-3', a partir da adesina p102 (GenBank: AE017332.1), esta por sua vez não é presente em nenhum outro patógeno respiratório de suínos. Todas as amostras foram testadas em duplicatas, aquelas que apresentaram variação maior do que 0,5 Ct, foram testadas novamente em triplicata.

A reação foi composta por 1X de Master mix Go taq® 10 µL (Promega, Madison, EUA), 1 µL a 10 nmol/ µL de cada primer (Invitrogen, EUA), 0,6 µL a 10 nmol/ µL da sonda de hidrólise (IDT, Iowa City- EUA), água ultrapura 5,4 µL e 2 µl de DNA por amostra, totalizando 20 µL de reação. A qPCR foi realizada em termociclador de tempo real CFX-96 (Biorad - EUA) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 39 ciclos de 95°C por 15 segundos e anelamento/ extensão a 55,7 °C por 1 minuto.

4.1.2. Lavado traqueobrônquico

Foram coletadas amostras de lavado traqueobrônquico aos 35dpi, logo após a eutanásia. O procedimento foi realizado introduzindo 20 mL de PBS (tampão fosfato salino) na traqueia próximo à árvore brônquica com auxílio de pipeta de vidro esterilizada. O pulmão foi massageado para uma boa distribuição pelas vias aéreas. Em seguida com um pipetador automático o volume foi recuperado, em torno de 10 mL. O produto foi armazenado em criotubos com 1,5 mL livres de DNAses e RNAses conservados a -80 °C até o processamento das amostras.

4.1.3. Lesões macroscópicas

Após a eutanásia dos animais aos 35 dias de infecção, o pulmão foi retirado de forma íntegra e suas porções dorsal e ventral foi fotografada, foi pontuada a presença de aderências e pleurites.

As lesões pulmonares compatíveis com PES foram pontuadas de acordo com a metodologia descrita por (STRAW et al., 1986). Sendo que as lesões podem variar de 0% (sem lesões) a 100% (todo o pulmão afetado). As características avaliadas foram consolidação vermelha e firme nos lobos apicais, cardíacos, acessórios e diafragmáticos.

4.1.4. Coleta de amostra de tecido pulmonar

Amostras das lesões pulmonares para realização do qPCR foram coletadas em duplicata das porções com lesões sugestivas de PES e acondicionadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da extração de DNA.

Já o fragmento destinado à histopatologia foi coletado e armazenado em formalina 10% por 24 horas, posteriormente conservadas em álcool 70%.

4.1.5. Lesões microscópicas

O processamento se deu seguindo a rotina histotécnica do laboratório de patologia do DVT-UFV. Os fragmentos embebidos em parafina foram seccionados em micrótomo com espessura de cinco micrômetros. Em seguida, as lâminas histológicas foram coradas em hematoxilina/eosina. A avaliação foi realizada utilizando microscópio óptico.

A classificação dos escores das lesões foi realizada semiquantitativamente com base em Hansen et al. (2010). Os cortes foram examinados sistematicamente pela avaliação das seguintes estruturas em cada corte: brônquios, bronquíolos e tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), ductos alveolares e alvéolos, incluindo septos alveolares, tecidos conjuntivos peribrônquicos, peribronquiolares e interoculares; e pleura. A hiperplasia BALT foi graduada da seguinte forma: (-) ausente; (1) leve, infiltração difusa de linfócitos nos tecidos peribrônquicos, peribronquiolares e perivasculares, incluindo a lâmina própria das vias aéreas; (2) aumento moderado da infiltração difusa de linfócitos e/ou presença de alguns nódulos linfóides; (3) número acentuado de nódulos linfóides. As lesões de broncopneumonia e pleurite receberam a mesma graduação, de acordo com a intensidade das lesões.

4.1.6. ELISA, detecção de anticorpos anti-Mhyo (IgG) e (IgA)

A coleta de sangue foi realizada nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35dpi no seio orbital. As amostras coletadas foram centrifugadas a 8.000 xg por 15 minutos, dos quais 1 mL de soro foi armazenado e mantido a -20°C até o uso.

Os anticorpos anti-Mhyo (IgG) foram detectados a partir de amostras de soro utilizando o teste de Mhyo Ab (IDEXX, EUA), um kit ELISA indireto comercial. O teste foi executado seguindo as recomendações do fabricante. O cálculo de S/P foi realizado de acordo com o fabricante, por se tratar de uma infecção experimental, valores de S/P acima de 0,3 foram considerados positivos.

Em relação ao ELISA de IgA em lavado traqueobrônquico (LTB), foi utilizada a metodologia padronizada por (MECHLER-DREIBI et al., 2021). O teste baseia-se na utilização dos reagentes e placas do kit comercial Mhyo Ab (IDEXX, EUA), com algumas modificações. Primeiramente, foi feito o bloqueio da placa com ovoalbumina 1.5% em PBS seguido de incubação em estufa a 37°C , após isto adicionou-se as amostras (diluídas em 1:10) e os controles positivos (um rol de 20 amostras de LTB previamente testadas) e então adicionado o conjugado anti-IgA de suíno na placa para que ocorra as ligações antigênicas.

As médias das densidades ópticas (DO) para cada uma das amostras (DOa) foram relacionadas com as DO encontradas para os controles positivos e negativos (CPx; CNx) a fim de serem calculados os valores S/P conforme a fórmula: $S/P = DOa - CNx/CPx - CNx$. Os valores obtidos dos poços contendo somente o conjugado (média de 4 poços) foram deduzidos dos valores das DO das amostras, pois nota-se adsorção inespecífica dos anticorpos conjugados com peroxidase na superfície das cavidades da placa.

Por fim, o *cutoff* entre as amostras positivas e negativas foi calculado a partir do valor de $DO\ CNx + 3 \times \text{desvio padrão}$ das amostras de LTB dos animais do grupo controle negativo do experimento, conhecidamente negativas para Mhyo, cujo valor de S/P foi de 0.182. As amostras com valores de S/P próximos a este foram consideradas negativas.

4.1.7. Detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias

Os testes para quantificação de citocinas em soro sanguíneo foram realizados pelos kits Invitrogen IL-10 Porcine ELISA Kit, IFN gamma Porcine ELISA Kit e TNF alpha Porcine ELISA Kit ThermoFisher. Estes kits são baseados em uma curva-padrão em um range de 500 a 7.8 pg/mL para IL-10 e IFN-gamma e de 1500 a 23.4 pg/mL. As amostras foram

testadas em duas placas. A curva padrão foi determinada pelo programa do leitor de ELISA e foi construída no modo 4-parâmetros, tendo assim, a concentração determinada pelos valores fornecidos pelo kit e de acordo com a quantificação obtida no teste.

4.1.8. Diagnóstico diferencial

Foram coletadas swabs do pulmão individualmente dos animais, sendo submetidas à extração de RNA total utilizando o Kit comercial de extração de RNA da Promega - ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems para realização do diagnóstico do vírus Influenza A utilizando a metodologia de PCR convencional os primers utilizados na reação de PCR como referência foram descritos por (FOUCHIER et al., 2000).

Para a detecção dos seguintes agentes bacterianos (*Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*) foi utilizada a técnica de qPCR com as amostras de DNA proveniente do BALF utilizando as metodologias descritas por (HAN et al., 2020; SUNAGA et al., 2020; FOUROUR et al., 2018; BONIFAIT et al., 2014; GOECKE et al., 2020) respectivamente.

4.1.9. Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos erros; e, o teste de Levene, para verificação da homogeneidade de variâncias. Os dados que não atenderam às premissas de normalidade dos erros e homoscedasticidade foram submetidos à transformações estatísticas. Os graus de liberdade da ANOVA para medidas repetidas foram ajustados pela correção de Greenhouse-Geisser para os fatores dia e interação dia x tratamento.

Os dados foram avaliados em modelos lineares com medidas repetidas no tempo e as comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 4.2.1 (R Core Team, 2022).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação tosse

A frequência de tosse do grupo controle, UFV01 e UFV02, foi observada diariamente como descrito na metodologia. O grupo controle, assim como os demais apresentou alguns eventos de tosse na primeira semana, potencialmente devido ao processo de inoculação, visto que um volume de 10ml de meio Friis ou inóculo foi instilado diretamente na via aérea inferior. A partir da primeira semana os animais do grupo UFV01 e UFV02 começaram a apresentar quadros de tosse compatíveis com a pneumonia enzoótica. A frequência do grupo UFV01 foi em alguns momentos numericamente superiores ao UFV02.

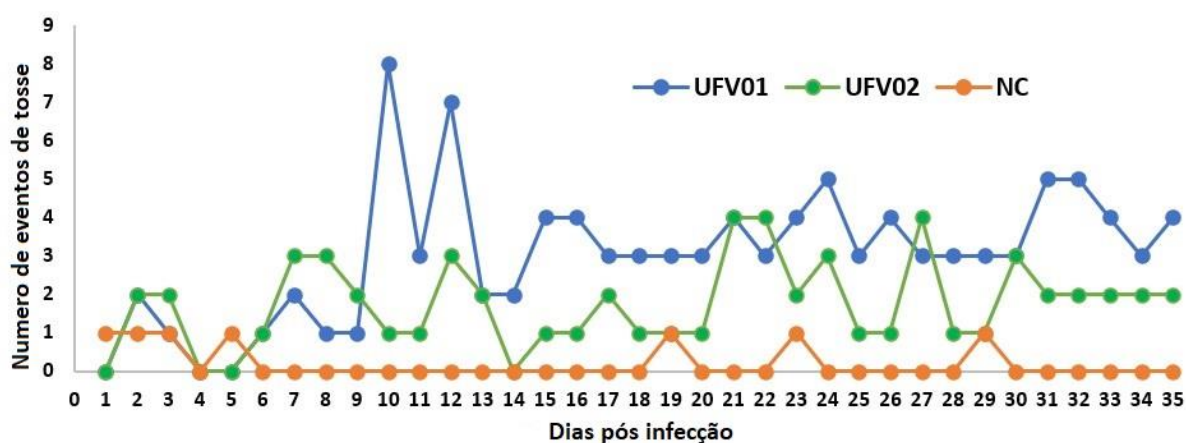


Figura 5: Gráfico avaliação frequência de tosse. Grupo controle (laranja). B- Grupo UFV01 (Azul). C- Grupo UFV02 (Verde).

5.2. Lesões macroscópicas

As lesões macroscópicas características da PES nos pulmões foram pontuadas de 0 a 100% (todo o tecido acometido). Os animais do grupo controle (figura 7, fotos A, B, C e D) apresentaram 0% de lesões macroscópicas (tabela 2), o que demonstrou inexistência de lesão associada ao Mhyo.

Já o grupo UFV01 (figura 7, fotos E, F, G, H, I, J, K e L) apresentou 11,75% (± 6.60) lesões macroscópicas aos 35 dpi (tabela 2) e o grupo UFV02 (figura 7, fotos M, N, O, P, Q, R, S e T) apresentou 3.125% (± 1.55). Como pode ser observado na figura 6, todos os grupos diferem estatisticamente entre si.

Tabela 2: Avaliação do índice de lesões macroscópicas dos grupos Controle, UFV01 e UFV02 aos 35 dias de infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* variando de 0 a 100%.

Índice de lesões macroscópicas			
ID	CN	ID UFV01	ID UFV02
A	0%	E 25% (pleurite fibrinosa)	M 2%
B	0%	F 4%	N 4% (Pleurite fibrinosa)
C	0%	G 6%	O 4%
D	0%	H 10% (Pleurite fibrinosa)	P 5%
		I 10%	Q 2%
		J 10%	R 5%
		K 12% (Pleurite crônica)	S 2%
		L 17%	T 1%
Media	0% ^c	11,75% ^a	3.125% ^b
Desvio padrão	0	6.60	1.55

Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$).

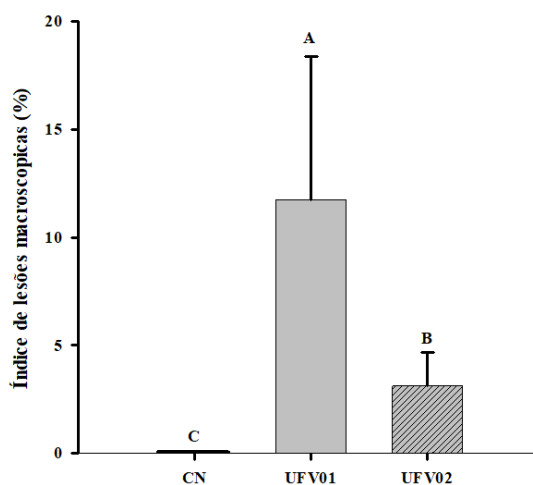


Figura 6: Gráfico de barras em uma escala de 0% (sem lesões) a 100% (pulmão todo afetado). * Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$). CN: controle negativo, UFV01: grupo de animais inoculado com a cepa UFV01 e UFV02: grupo de animais inoculados com a cepa UFV02.

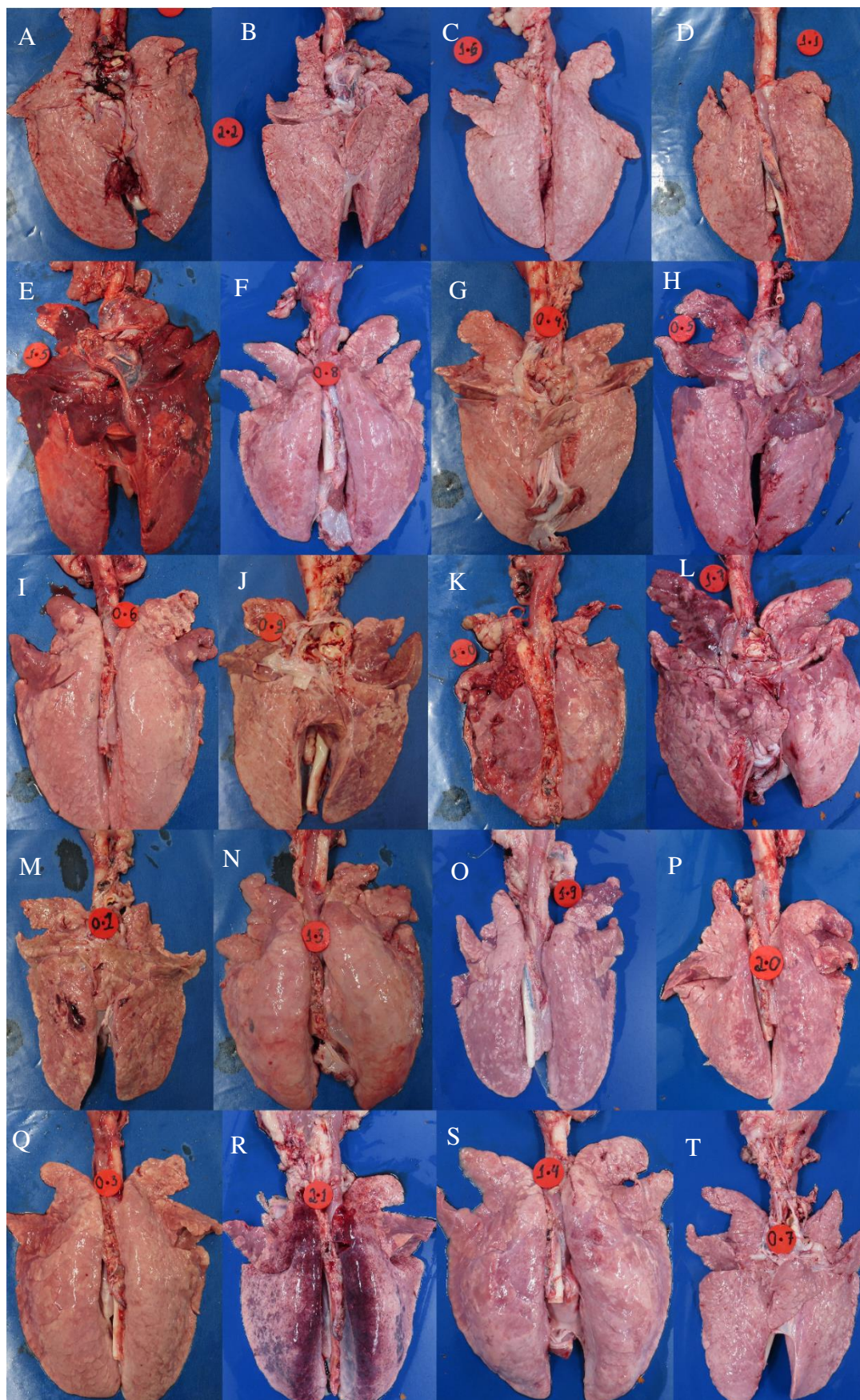


Figura 7: Fotos Individuais dos pulmões de animais do grupo controle (A, B, C e D), pulmão de animais inoculados com a cepa UFV01 (E, F, G, H, I, J, K e L) e pulmão de animais inoculados com a cepa UFV02 (M, N, O, P, Q, R, S e T).

5.3. Lesões microscópicas

As lesões microscópicas encontradas nos fragmentos processados foram de broncopneumonia, hiperplasia de BALT e pleurite. As mesmas foram pontuadas de acordo com a tabela 3, em ausente (-), discreta (1), moderadas (2) e intensas (3). A característica histológica das lesões pontuados podem ser observadas na figura 9.

Na figura 8 estão apresentadas as frequências de cada respectiva lesão e seu grau de acometimento. Pode-se observar que o grupo controle negativo não apresentou lesões. O grupo UFV01 apresentou frequência de 50% de lesões discretas de broncopneumonia (4/8), 37,5% de lesões moderadas (3/8) e 12,5% (1/8) de lesões intensas. Nas análises do BALT, 50% apresentavam lesões moderadas (4/8) e 50% lesões intensas (4/8). O grupo UFV02 apresentou 62,5% de lesões discretas de broncopneumonia (5/8) e 37,5% de lesões moderadas (3/8). As lesões de BALT têm uma frequência de 62,5% de lesões de broncopneumonia discretas (5/8), 25% moderadas (2/8). Um (1/8) animal não apresentou lesão no grupo UFV02. Apenas o grupo UFV01 apresentou casos de pleurite: 25% discretas (2/8) e 12,5% moderadas (1/8).

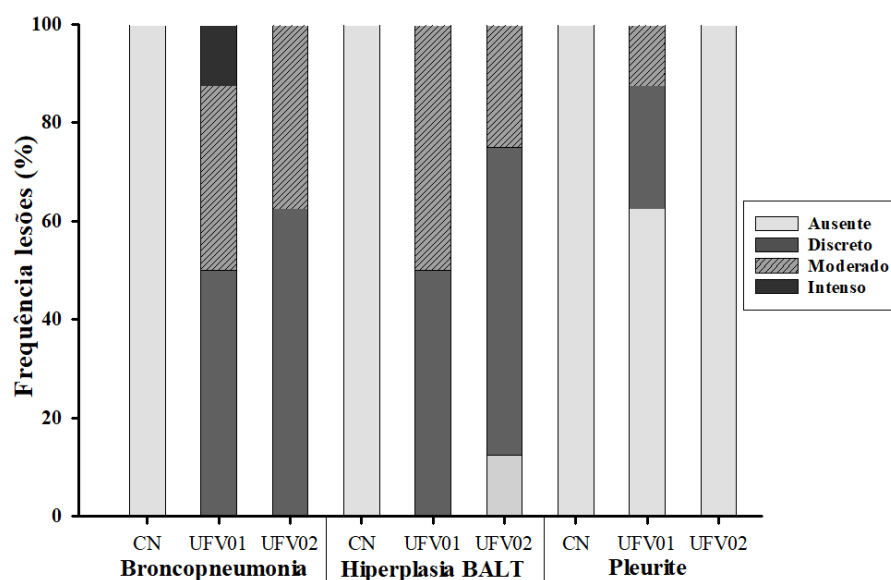


Figura 8: Gráfico barras com as frequências de lesões microscópicas discriminados em lesões de broncopneumonia, hiperplasia de BALT e Pleurite associados aos graus de lesão dos pulmões dos grupos de animais CN, UFV01 e UFV02.

Ao comparar as médias das lesões de acordo pontuações descritas na tabela 3, o grupo UFV01 apresentou 1,62 para broncopneumonia, 1,5 para hiperplasia de BALT e 0,5 para pleurite. Já o grupo UFV02 apresentou 1,37; 1,12 e 0,0 respectivamente para as 3 lesões supracitadas.

As frequências e as médias das lesões microscópicas pontuadas são mais intensas no grupo UFV01 em relação ao grupo UFV02

Tabela 3: Descrição das lesões microscópicas quantificadas (broncopneumonia, hiperplasia BALT e pleurite).

Grupo	Animal	Broncopneumonia	Hiperplasia BALT	Pleurite	
CN	A	-	-	-	
	B	-	-	-	
	C	-	-	-	
	D	-	-	-	
Média		0,00	0,00	0,00	
UFV01	E	3	1	2	
	F	1	1	-	
	G	1	2	-	
	H	1	2	1	
	I	2	2	-	
	J	2	1	-	
	K	2	2	-	
	L	1	1	1	
	Média		1,62	1,5	0,5
	UFV02	M	2	1	-
		N	1	2	-
O		2	1	-	
P		2	1	-	
Q		1	1	-	
R		1	2	-	
S		1	1	-	
T		1	-	-	
Média		1,37	1,12	0,00	

Ausência de lesões (-), lesão discreta (1), lesão moderada (2) e lesão intensa (3)

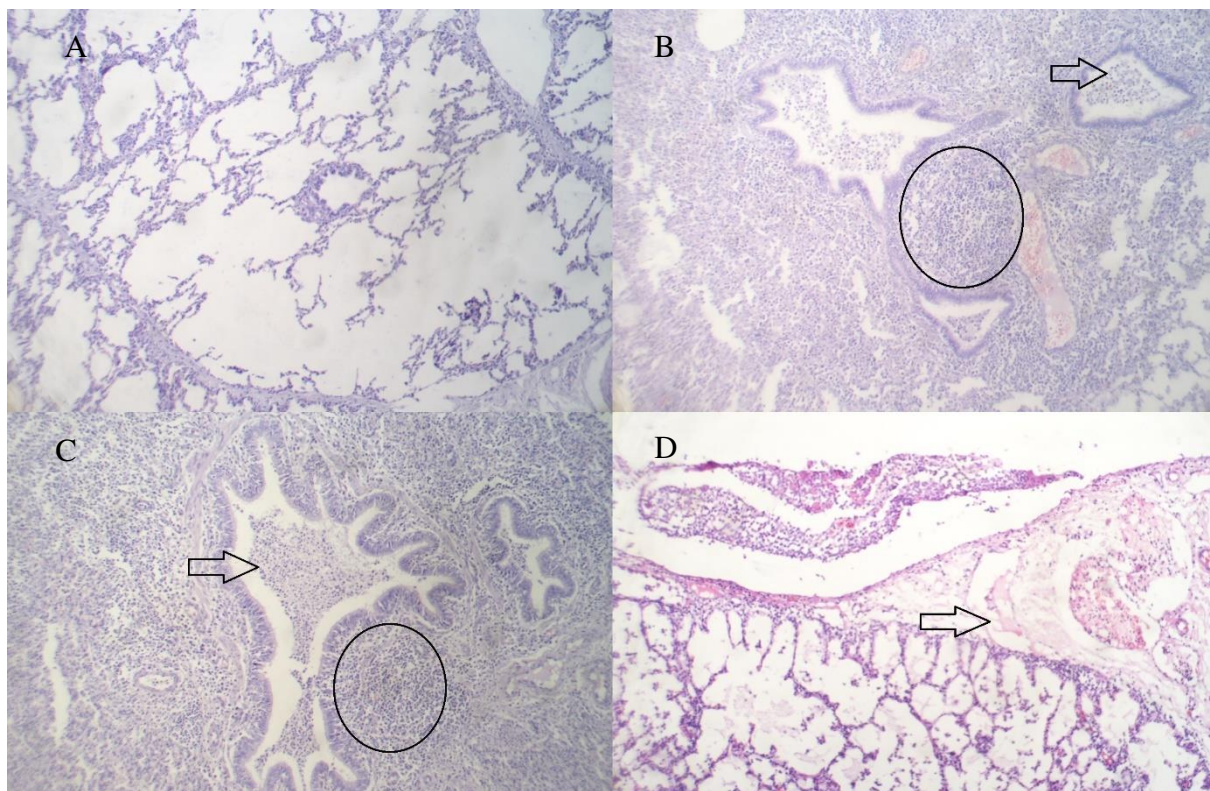


Figura 9: A- pulmão de um animal do grupo controle totalmente sem lesões, B-C Focos de hiperplasia de BALT discreta (círculos) e broncopneumonia (setas), D- Pleurite (seta).

5.4. Ensaio de ELISA para classe IgG

Os animais do grupo controle permaneceram negativos ao longo do estudo. A dinâmica de soroconversão de ambos os grupos não foi uniforme, sendo que os animais do grupo UFV01 iniciaram a soroconversão aos 21dpi 12,5% (1/8), 28dpi 75% (6/8), ao fim dos 35dpi 100% (8/8) foram IgG positivos. Já o grupo UFV02 aos 35 dpi apenas 50% (4/8) do grupo havia soroconvertido (tabela 4). Os níveis de anticorpos gerados pelo UFV01 foram estatisticamente superiores ao UFV02 aos 21, 28 e 35dpi, como pode ser observado na figura 10.

Tabela 4: Dinâmica da soroconversão de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02.

Grupos	ID	DPI						
		-7	0	7	14	21	28	35
CN	A	-	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-	-
% soroconversão		0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
UFV01	E	-	-	-	-	-	-	+
	F	-	-	-	-	-	+	+
	G	-	-	-	-	+	+	+
	H	-	-	-	-	-	+	+
	I	-	-	-	-	-	+	+
	J	-	-	-	-	-	+	+
	K	-	-	-	-	-	-	+
	L	-	-	-	-	-	+	+
% soroconversão		0%	0%	0%	0%	12,5 %	75 %	100 %
UFV02	M	-	-	-	-	-	-	+
	N	-	-	-	-	-	-	+
	O	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-
	Q	-	-	-	-	-	-	+
	R	-	-	-	-	-	-	-
	S	-	-	-	-	-	-	+
	T	-	-	-	-	-	-	-
% soroconversão		0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%

* Indica a primeira vez que o animal apresentou resultado positivo no ELISA ($SP > 0,3$).
Negativo (-), Positivo (+)

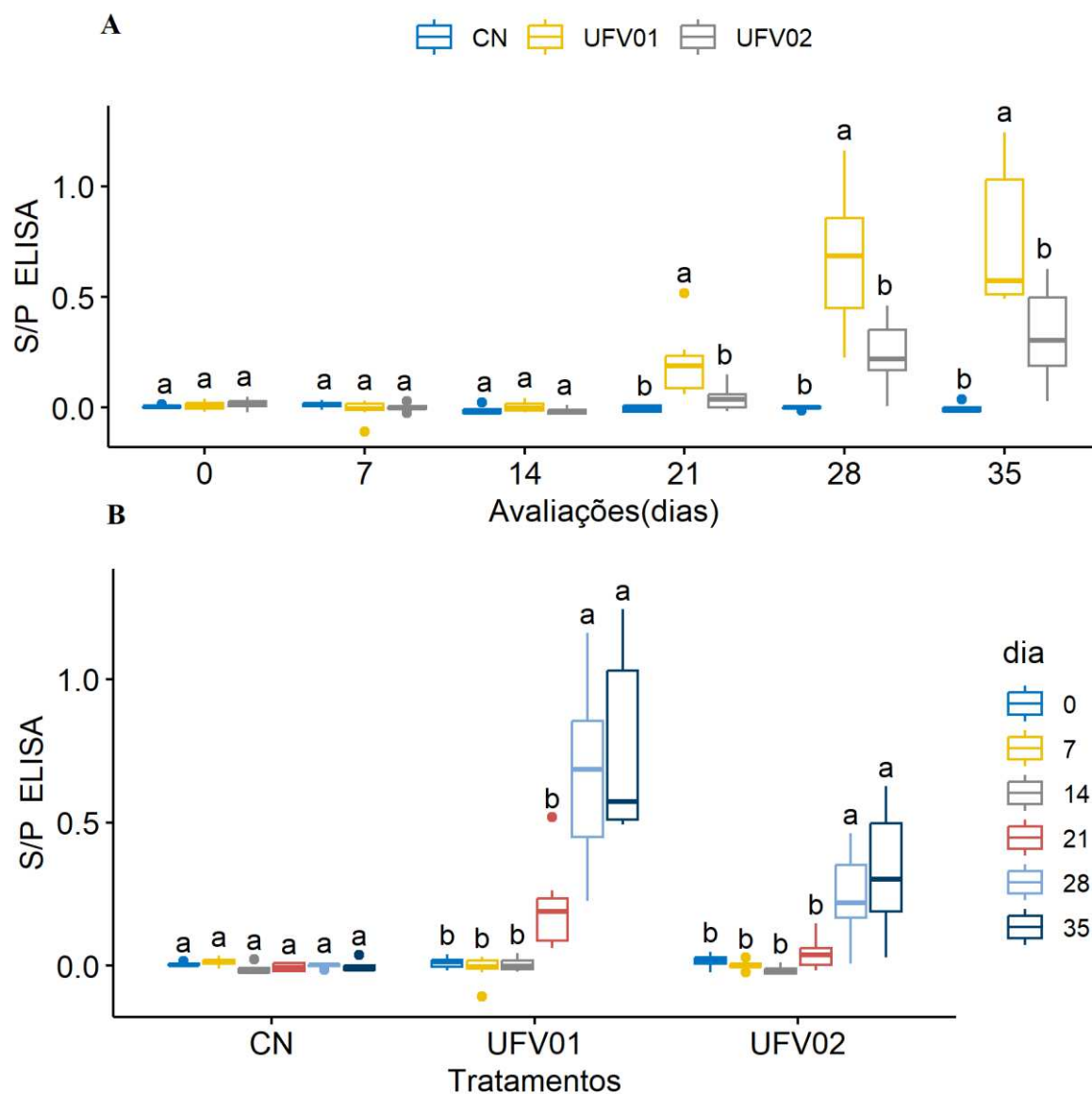


Figura 10: Gráfico BoxPlot dinâmica da soroconversão de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. A- Comparação estatística da soroconversão entre os grupos dentro do mesmo dia. B- Comparação estatística da soroconversão dentro do tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Avaliando as diferenças estatísticas dentro do grupo ao longo dos dias, o grupo controle negativo permaneceu inalterado, enquanto os grupos UFV01 e UFV02 diferiram estatisticamente dentro do tratamento nos dias 28 e 35dpi em comparação aos dias 0, 7, 14 e 21dpi.

5.5. ELISA IgA lavado traqueobrônquico

Foi realizado análise de detecção de anticorpos IgA presentes nos lavados traqueobrônquicos dos 3 grupos. O grupo CN não apresentou detecção de anticorpos IgA anti-Mhyo. O grupo UFV01 100% (8/8) dos indivíduos foram positivos, já o grupo UFV02 somente 50% (4/8) foi positivo (tabela 5). Como pode ser observado na tabela 4 e 5, os animais IgA positivos foram os mesmos indivíduos que foram IgG positivos (M, N, G e S). A média dos níveis de anticorpos entre os grupos UFV01 e UFV02 não diferiram estatisticamente como pode ser observado na figura 11, porém a frequência de animais positivos entre os grupos diferiu.

Tabela 5: Detecção anticorpos IgA em lavado traqueobrônquico de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. Os anticorpos foram detectados usando o ELISA modificado (kit Mhyo ab, IDEXX, EUA).

35 DPI					
ID	CN	ID	UFV01	ID	UFV02
A	-	E	+	M	+
B	-	F	+	N	+
C	-	G	+	O	-
D	-	H	+	P	-
		I	+	Q	+
		J	+	R	-
		K	+	S	+
		L	+	T	-
% positivos		0%		100%	
		100%		50%	

Negativo (-), Positivo (+)

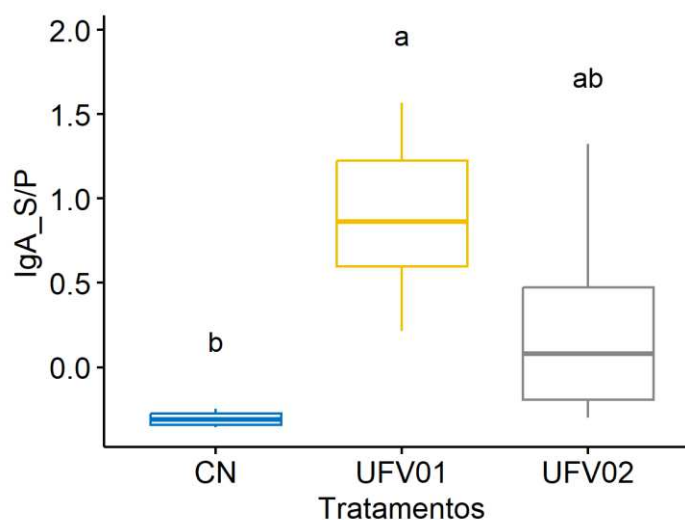


Figura 11: Gráfico BoxPlot detecção de anticorpos IgA anti-Mhyo em lavado traqueobrônquico aos 35 dias pós de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma*

hyopneumoniae com isolados UFV01 e UFV02. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.6. qPCR swab laringal

Foram coletados swabs de laringe e submetidos à técnica de qPCR para avaliar a positividade e a carga bacteriana excretada pelos grupos. O início das excreções se deu aos 14dpi. Podemos observar na tabela 6 que o grupo UFV01 teve 75% positividade aos 14dpi ($3,76 \times 10^2$ cópias/ μL), 87,5% aos 21dpi ($4,36 \times 10^2$ cópias/ μL), 100% aos 28dpi ($1,44 \times 10^3$ cópias/ μL) e 87,5% aos 35dpi ($1,25 \times 10^4$ cópias/ μL).

Já o grupo UFV02 também iniciou sua excreção aos 14dpi, porém com uma positividade de 37,5% ($1,82 \times 10^2$ cópias/ μL), aos 21dpi 75% ($8,33 \times 10^2$ cópias/ μL), 28dpi (87,50%) e aos 35dpi 87,5% ($2,50 \times 10^3$ cópias/ μL). Cabe ressaltar que um indivíduo do grupo UFV02 (T), apresentou resultado negativo em todos os dias testados.

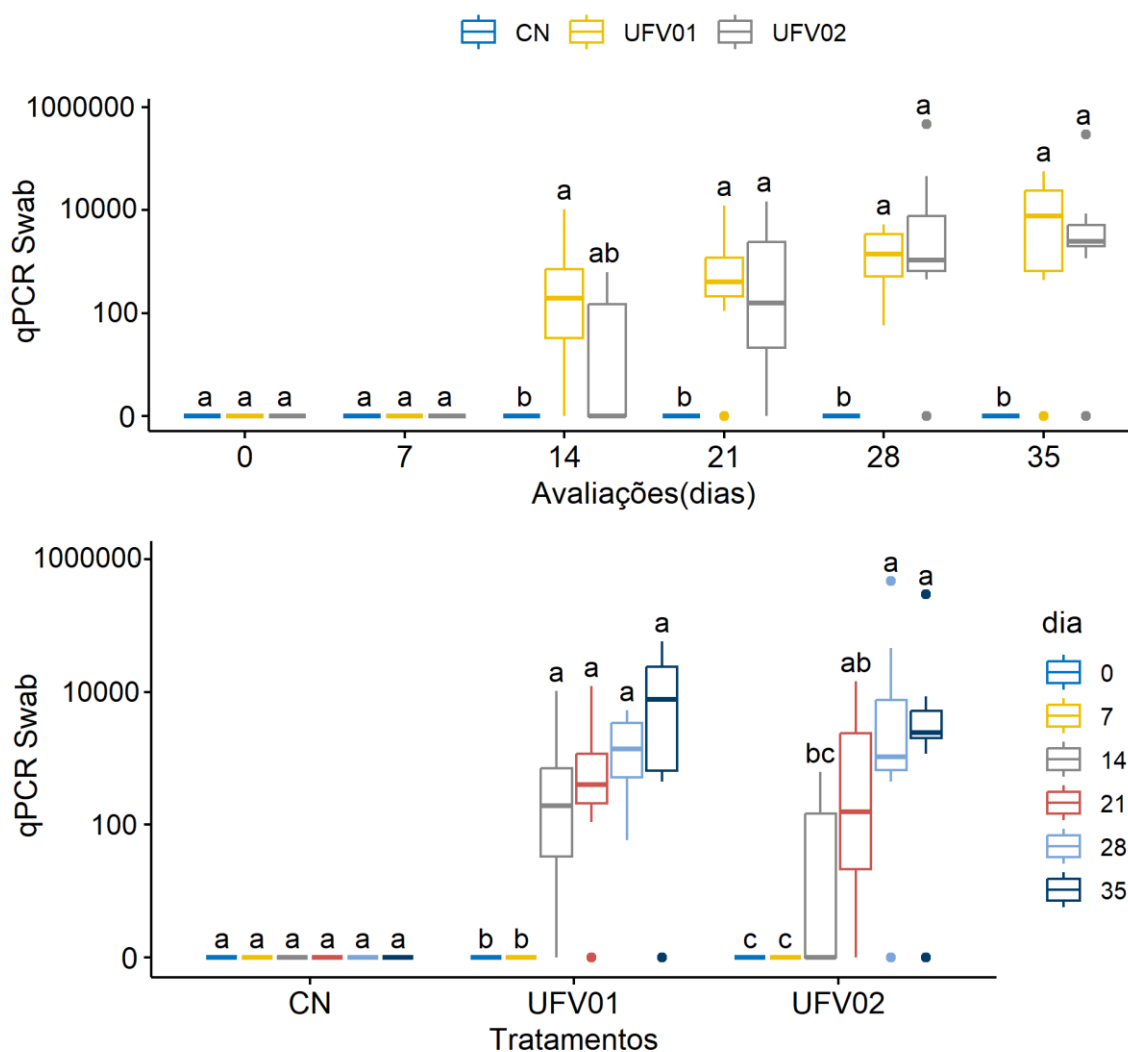


Figura 12: Gráfico BoxPlot dinâmica de detecção de cópias de DNA do *Mycoplasma hyopneumoniae* em swab laringal de suínos inoculados experimentalmente com isolados

UFV01 e UFV02. A- Comparação estatística da excreção entre os grupos dentro do mesmo dia. B- Comparação estatística da excreção dentro do tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6: Detecção de cópias de fragmento de DNA do *Mycoplasma hyopneumoniae* em swab laringal de suínos inoculados experimentalmente com isolados UFV01 e UFV02.

Grupos	ID	DPI							
		-7	0	07	14	21	28	35	
CN	A	-	-	-	-	-	-	-	
	B	-	-	-	-	-	-	-	
	C	-	-	-	-	-	-	-	
	D	-	-	-	-	-	-	-	
	Media	0	0	0	0	0	0	0	
	% Positividade	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
UFV01	E	-	-	-	2,29x10 ^{3*}	1,09x10 ²	3,94x10 ³	-	
	F	-	-	-	2,72x10 ^{2*}	1,22x10 ⁴	3,26x10 ³	4,42x10 ²	
	G	-	-	-	4,81x10 ^{2*}	1,70x10 ³	1,80x10 ³	5,79x10 ⁴	
	H	-	-	-	-	3,77x10 ^{2*}	5,34x10 ³	1,25x10 ⁴	
	I	-	-	-	-	-	5,71x10 ¹	2,87x10 ⁴	
	J	-	-	-	1,38x10 ^{2*}	2,59x10 ²	4,65x10 ²	7,37x10 ²	
	K	-	-	-	1,03x10 ^{4*}	1,05x10 ³	5,35x10 ²	4,82x10 ³	
	L	-	-	-	1,05x10 ^{2*}	4,36x10 ²	1,07x10 ³	2,25x10 ⁴	
		Media	0	0	0	3,76x10 ²	4,36x10 ²	1,44x10 ³	1,25x10 ⁴
		% Positividade	0%	0%	0%	75%	87,50%	100%	87,50%
UFV02	M	-	-	-	0,00	1,47x10 ^{4*}	4,20x10 ³	4,40x10 ³	
	N	-	-	-	6,27x10 ^{2*}	1,46x10 ²	4,63x10 ⁴	8,53x10 ³	
	O	-	-	-	-	-	4,45x10 ^{2*}	2,42x10 ³	
	P	-	-	-	-	1,50x10 ^{3*}	7,82x10 ²	2,43x10 ³	
	Q	-	-	-	1,82x10 ^{2*}	1,66x10 ²	4,72x10 ⁵	3,00x10 ⁵	
	R	-	-	-	1,36x10 ^{2*}	5,85x10 ¹	7,59x10 ²	1,17x10 ³	
	S	-	-	-	-	9,74x10 ^{3*}	1,44x10 ³	2,50x10 ³	
	T	-	-	-	-	-	-	-	
	Media	0	0	0	1,82x10 ²	8,33x10 ²	1,44x10 ³	2,50x10 ³	
	% Positividade	0%	0%	0%	37,50%	75%	87,50%	87,50%	

* Indica a primeira vez que o animal apresentou resultado no qPCR (ct < 37). Negativo (-), Positivo (+).

No que se refere as diferenças estatísticas detectadas das cargas bacterianas excretadas ao longo da dinâmica experimental, pode ser observado na figura 12 que ambos os grupos desafiados diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ao longo de todo período experimental. Ambos os grupos testes (UFV01 e UFV02) a partir do dia 14 até o dia 35dpi tiveram uma tendência de aumento numérico da excreção de cópias de DNA (tabela 06 e figura 12 A), mas não diferiram estatisticamente entre si.

5.7. Quantificação IgG no soro e % de qPCR positivos grupos UFV01 e UFV02

Na figura 13A podemos observar que a soroconversão do grupo UFV01 se iniciou entre os dias 14 e 21dpi, sendo crescente até o dia 28dpi tendo um ligeiro decréscimo aos 35 dias pós infecção, momento em que o grupo alcançou 100% de soroconversão ($SP > 0,3$), dado apresentado na tabela 4. Em contrapartida podemos observar na figura 13B que o grupo UFV02 teve uma soroconversão menor, tendo o início da sua soroconversão a partir do dia 21dpi, sendo que aos 35dpi apenas 50% dos animais haviam soroconvertido ($SP > 0,3$) presente na tabela 4.

Como apresentado na tabela 6 e figura 13 A e B. Os grupos diferiram na porcentagem de positividade ao longo dos dias, enquanto o grupo UFV01 apresentou uma taxa de positividade de 75; 87,5; 100 e 87,5% nos dias 14, 21, 28 e 35 dpi respectivamente. O grupo UFV02 apresentou 37,5; 75; 87,5 e 87,5% nos respectivos dias supracitados.

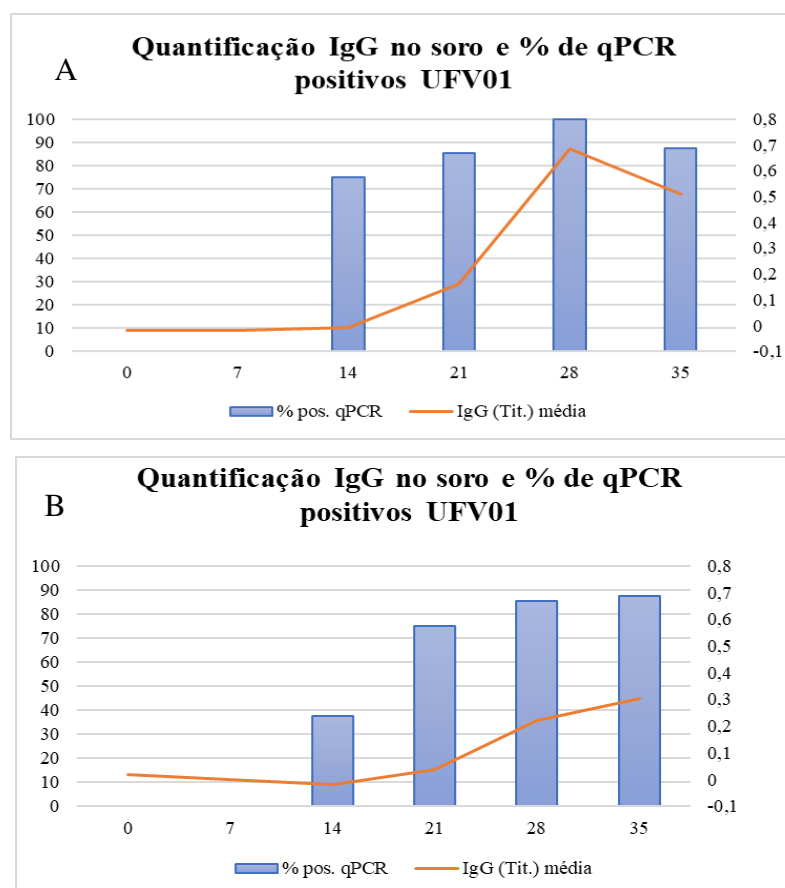


Figura 13: Quantificação IgG no soro e % de qPCR positivos grupos. A- Grupo UFV01. B- Grupo UFV02.

5.8. qPCR lavado traqueobrônquico, tecido e swab tecido lesionado

As amostras de LTB, tecido e swab do tecido foram submetidas à análise de qPCR com objetivo de avaliar a carga bacteriana presente no sistema respiratório dos animais aos 35dpi no momento da eutanásia dos indivíduos (figura 14 A, B e C).

Podemos observar na tabela 7 que o grupo CN foi negativo em todas as 3 análises descritas, atestando mais uma vez sua completa negatividade. O grupo UFV01 foi 100% (8/8) positivo nas análises de LTB, tecido e swab tecido, com respectiva carga média de $3,57 \times 10^5$ cópias/ μL , $2,63 \times 10^6$ ng de DNA/ μL e $6,69 \times 10^6$ cópias/ μL . O grupo UFV02 teve 87,5% de positividade em todas as 3 avaliações, apresentando carga bacteriana média de $6,32 \times 10^6$, $3,92 \times 10^6$ e $7,18 \times 10^6$ cópias/ μL respectivamente. Vale ressaltar que mais uma vez o animal T, pertencente ao grupo UFV02 se manteve negativo.

Tabela 7: Detecção de cópias do DNA de *Mycoplasma hyopneumoniae* em lavado traqueobrônquico, tecido lesionado e swab do tecido lesionado aos 35 dias pós infecção.

		35 DPI		
Grupos	ID	Lavado traqueobrônquico	Tecido	Swab Tecido
CN	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
Media		0	0	0
% Positividade		0%	0%	0%
UFV01	E	$1,32 \times 10^4$	$1,61 \times 10^4$	$2,43 \times 10^3$
	F	$7,76 \times 10^6$	$1,35 \times 10^7$	$1,15 \times 10^5$
	G	$2,32 \times 10^6$	$8,95 \times 10^6$	$4,37 \times 10^5$
	H	$6,77 \times 10^4$	$1,14 \times 10^7$	$1,22 \times 10^3$
	I	$1,89 \times 10^5$	$1,41 \times 10^6$	$1,32 \times 10^5$
	J	$2,14 \times 10^5$	$7,98 \times 10^3$	$4,91 \times 10^4$
	K	$5,01 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$	$1,52 \times 10^4$
	L	$6,16 \times 10^5$	$3,85 \times 10^6$	$8,46 \times 10^4$
Media		$3,57 \times 10^5$	$2,63 \times 10^6$	$6,69 \times 10^4$
% Positividade		100%	100%	100%
UFV02	M	$2,08 \times 10^6$	$6,31 \times 10^6$	$1,80 \times 10^5$
	N	$6,32 \times 10^6$	$6,11 \times 10^5$	$7,18 \times 10^4$
	O	$8,40 \times 10^5$	$6,91 \times 10^6$	$6,18 \times 10^4$
	P	$1,89 \times 10^6$	$3,92 \times 10^6$	$3,88 \times 10^5$
	Q	$1,27 \times 10^7$	$3,16 \times 10^6$	$4,66 \times 10^4$
	R	$1,09 \times 10^7$	$8,20 \times 10^6$	$6,55 \times 10^5$
	S	$1,16 \times 10^7$	$2,39 \times 10^5$	$5,55 \times 10^4$
	T	-	-	-
Media		$6,32 \times 10^6$	$3,92 \times 10^6$	$7,18 \times 10^4$
% Positividade		87,50%	87,50%	87,50%

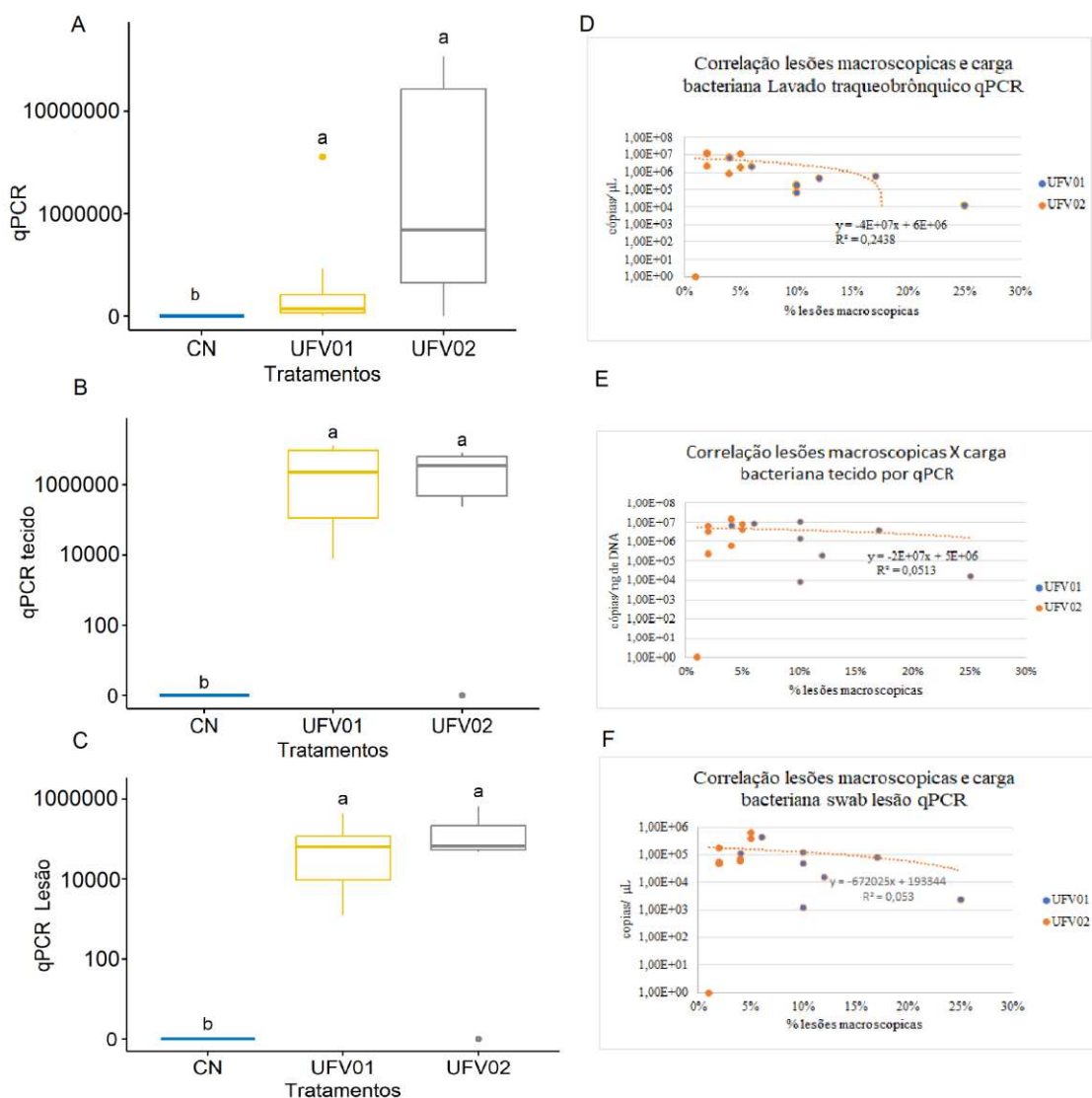


Figura 14: Gráfico BoxPlot detecção de cópias de fragmento do gene P102 de *Mycoplasma hyopneumoniae* de suínos inoculados experimentalmente com isolados UFV01 e UFV02. A- Detecção em lavado traqueobrônquico. B- Detecção em tecido pulmonar lesionado. C- Detecção em swab de tecido pulmonar lesionado. Letras diferentes indicam diferença significativa detectada no teste de Tukey dentro do tratamento ($p < 0,05$). Gráfico de correlação por regressão linear simples. D- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana lavado traqueobrônquico. E- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana tecido. E- Correlação entre lesões macroscópicas e carga bacteriana swab lesão.

Ao realizar a correlação entre as cargas bacterianas detectadas no Lavado traqueobrônquico ($r^2 = 0,2438$), tecido ($r^2 = 0,0513$) e swab da lesão ($r^2 = 0,053$) (figura 14, D, E e F), não foi encontrada correlação com o grau de lesão macroscópica aos 35 dias dpi.

5.9. Citocinas

Foi realizada a detecção no soro das seguintes citocinas IL-10, IFN gamma e TNF alpha utilizando kits comerciais. O IFN gamma não foi detectado em nenhum dos soros dos animais em todos os *time points*, possivelmente sua concentração sanguínea se encontrava abaixo da faixa de detecção do teste.

Já a citocina IL-10, podemos observar na figura 15A um aumento de sua concentração aos 7dpi em todos os 3 grupos testes, mas sem diferenças estatísticas entre eles. E posteriormente um decréscimo de sua concentração ao longo do estudo.

O TNF alpha se manteve mais alto nos grupos UFV01 e UFV02 em comparação ao grupo CN, porém sem configurar diferença estatística. A maior diferença estatística que pode ser observada na figura 20 se deu aos 28dpi (figura 15B).

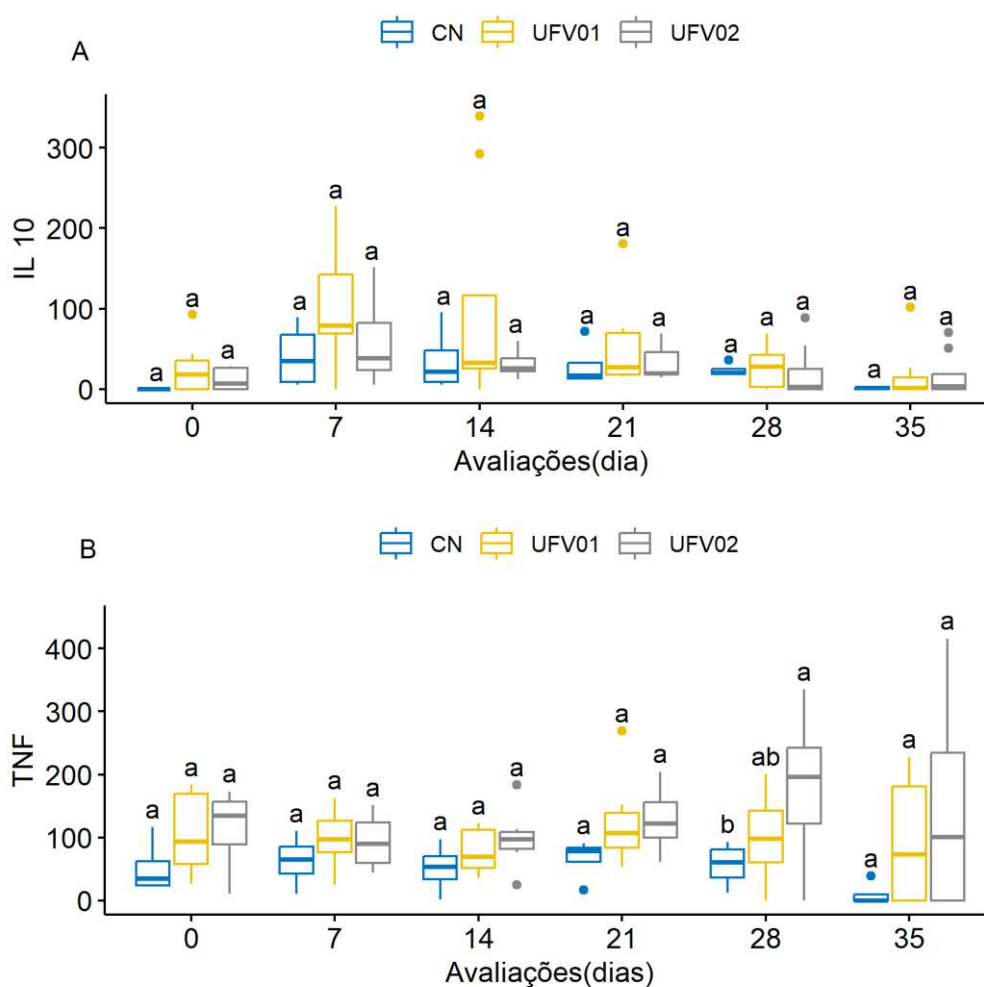


Figura 15: Gráfico BoxPlot dinâmica de detecção citocinas no soro de suínos inoculados experimentalmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* com isolados UFV01 e UFV02. A- Detecção anti-inflamatória IL-10 em pg/mL. B- Detecção citocina pró inflamatória TNF alpha em pg/mL.

5.1.1. Diagnóstico Diferencial

Nos ensaios de detecção de Influenza A não foi observada a presença de bandas de amplificação no gel de agarose do pool 1 (CN), 2 (UFV01) e 3 (UFV02), consideramos que não foi detectada a presença do vírus da Influenza A nas amostras analisadas.

Todos os animais foram negativos para *Streptococcus suis* e *Glaesserella parasuis*. Os grupos UFV01 e UFV02 foram 100% positivos para *Mycoplasma hyorhinis*. Para *Actinobacillus pleuropneumoniae* o grupo UFV01 apresentou 25% de positividade (animal H e K). Todos os 3 grupos foram 100% positivos para *Pasteurella multocida*.

5.1.2. Mortalidade

Ao fim dos 35 dias de estudo, após a última coleta de sangue e swab laringeal dos animais, o animal E, pertencente ao grupo UFV01 veio a óbito. O mesmo apresentou sinais clínicos de compatíveis com insuficiência respiratória. Foi realizada a necropsia completa do indivíduo e não foi encontrado nenhum achado tanto macroscópico como microscópico além das lesões pulmonares pontuados.

Em se tratando das lesões pulmonares, este animal apresentou maior grau de lesão de todos os animais do estudo, cerca de 25% (figura 16) e também apresentava lesões de acometimento de agentes etiológicos secundários. Sendo assim a mortalidade do grupo foi de 12,5% (1/8).

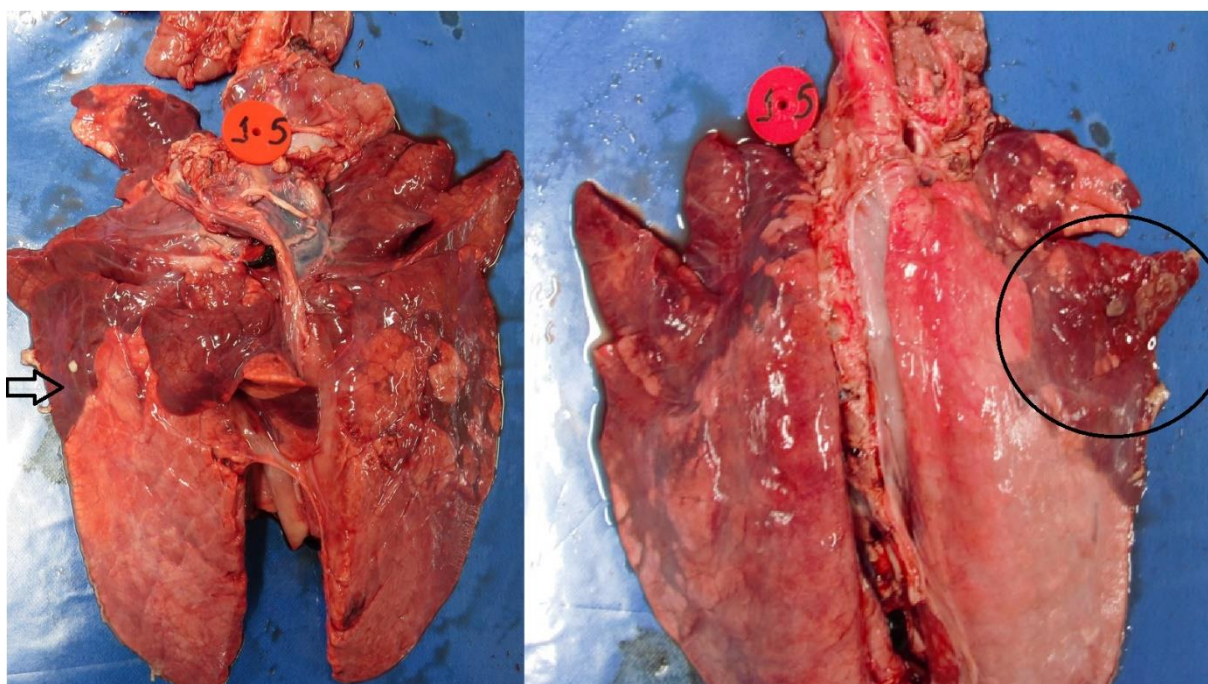


Figura 16: Fotos lesões do animal E pertencente ao grupo UFV01. Estão sendo apontadas as lesões de acometimentos secundário.

6. DISCUSSÃO

O grupo controle não apresentou sinais clínicos compatíveis com a pneumonia enzoótica. Por outro lado, os grupos UFV01 e UFV02 a partir do sétimo dia iniciou o aparecimento de uma tosse característica, que persistiu durante todo o estudo. O grupo UFV01 apresentou uma frequência numericamente superior ao grupo UFV02. Garcia-Morante et al. (2022) ressaltam que o início da tosse em suínos infectados experimentalmente pode ser variável e intermitente, ocorrendo entre 1 e 3 semanas após a infecção.

Atualmente há apenas 26 isolados de Mhyo completamente caracterizados no mundo, sendo que muitos dos quais suas patogenicidades são desconhecidas. No Brasil havia apenas dois isolados sequenciados 7422 e 7448 (SIQUEIRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2005) e agora os isolados UFV01 e UFV02 propostos neste estudo, totalizando 4 isolados brasileiros.

Os mecanismos imunopatológicos e ambientais que levam à formação das lesões macroscópicas e conseqüentemente à manifestação da doença clínica é multifatorial. Porém em infecções experimentais com cepas virulentas é descrito que o pico máximo de lesão macroscópica ocorre aos 28dpi e decrescem ao longo do tempo até formar um tecido cicatricial (GARCIA-MORANTE et al., 2017b; VICCA et al., 2003; REDONDO et al., 2009; GARCIA - MORANTE et al., 2022). Dito isto, o grupo inoculado com a cepa UFV01 apresentou 11,75% (± 6.60) dos pulmões acometidos com lesão, o grupo dos animais inoculados com a cepa UFV02 apresentou 3.125% (± 1.55) e o grupo controle negativo apresentou 0% de lesão aos 35 dias pós-infecção. Ambos os grupos diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Almeida et al. (2020) ao realizarem uma infecção experimental utilizando a cepa 232 (USA) encontraram que as médias de área de lesão obtida nos pulmões dos animais foi aos 28dpi e esta apresentou uma extensão de 15,84%, sendo esta cepa considerada de alta virulência por muitos trabalhos (WU et al., 2022; LEAL ZIMMER et al., 2020). VICCA et al. (2003) ao compararem diferentes isolados em uma infecção experimental classificaram os isolados em alta, média e baixa patogenicidade, sendo que as cepas de alta patogenicidade apresentaram entre 13,5% ($\pm 7,3$) a 15,8% ($\pm 7,4$) de extensão de lesão nos pulmões de suínos inoculados e os isolados de baixa patogenicidade apresentaram este indicador entre 1,7 ($\pm 2,3$) a 5,1 ($\pm 4,8$). Sendo assim analisando os resultados e parâmetros dos estudos de Almeida et al. (2020) e Vicca et al. (2003), o isolado UFV01 demonstrou ser capaz de causar um maior grau de lesão macroscópica pulmonar do que a cepa UFV02. Considerando os parâmetros

indicados nos trabalhos supracitados, o isolado UFV01 apresentou alta/média patogenicidade e a cepa UFV02 apresentou baixa patogenicidade.

Já o escore de lesão microscópica foi pontuada em ausente (-), leve (1), moderada (2) e intensa (3). O grupo controle negativo não apresentou nenhum tipo de lesão. Os Grupos UFV01 e UFV02 apresentaram as lesões de broncopneumonia e hiperplasia de BALT, porém com frequências diferentes. As lesões encontradas no grupo inoculado com a cepa UFV01 foram de intensidade superior ao grupo inoculado com a cepa UFV02. Adicionalmente, apenas o grupo UFV01 apresentou casos de pleurite, indicando um acometimento secundário. O grupo UFV01 apresentou 25% de positividade para *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 100% positivos para *Mycoplasma hyorhinis* e *Pasteurella Multocida*. Enquanto o grupo UFV02 foi positivo apenas para *Mycoplasma hyorhinis* e *Pasteurella Multocida*, sem apresentação de casos de pleurite. O acometimento secundário evidenciado pelos casos de pleurite do grupo UFV01 potencialmente ocorreram devido ao fato deste isolado ter estimulado um maior grau de lesão, predispondo os animais a infecções secundárias pelos agentes supracitados.

Vranckx et al. (2012) estudaram cinco rebanhos de suínos positivos para Mhyo e pontuaram as lesões micro e macroscópicas e estabeleceram a porcentagem de animais com pneumonia e pleurite de cada rebanho no momento do abate. A granja (A) apresentou 98% dos animais com pneumonia, 23% de pleurite, escore de lesão macroscópica de 0–33,3% e pontuação microscópica de $11,9 \pm 0,6$. A granja B (74%; 18%; 0–26,7 e $9,2 \pm 0,7$), C (38%; 2%; 2%; 0–6,7% e $1,7 \pm 0,3$) e D (46%; 7%; 0–31,7% e $4,0 \pm 0,7$) respectivamente. Este estudo confirma que quanto maior for a presença de pneumonia, maior é a incidência de pleurite, conseqüentemente maior acometimento pulmonar potencialmente por agentes secundários.

O recrutamento linfocitário e sua capacidade mitótica no tecido pulmonar gera a lesão descrita como hiperplasia de BALT (MESSIER, S., ROSS, 1991), sendo esta descrita como uma lesão típica causada pelo Mhyo. Já as lesões de broncopneumonia e pleurite advém de acometimento bacteriano secundário dentre os quais podem estar envolvidos agentes como *Pasteurella Multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Glasserella parasuis*, entre outros (DE CONTI et al., 2021). As médias das lesões microscópicas pontuadas (broncopneumonia, hiperplasia de BALT e pleurite) foram significativamente superiores no grupo UFV01 (1,62; 1:5 e 0,5) enquanto o grupo UFV02 alcançou (1,37; 1,12 e 0,0) respectivamente para as 3 lesões supracitadas.

Outro ponto importante avaliado foi a soroconversão dos animais pelo ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Após o desafio o Mhyo coloniza o trato respiratório e estimula as respostas imunes humorais a produzir anticorpos IgG e IgA (DING et al., 2021). No estudo a soroconversão não foi uniforme (tabela 4), o grupo UFV01 se iniciou aos 21dpi e apresentou soroconversão completa aos 35dpi (100%), já o grupo UFV02 apenas 50% soroconverteu aos 35dpi. Este resultado indica que a resposta imune por parte do hospedeiro contra o isolado UFV01 foi maior do que o UFV02, formando conseqüentemente uma maior resposta imune adaptativa ao Mhyo. A partir dos 21dpi o grupo UFV01 diferiu estatisticamente dos demais grupos em relação aos níveis de anticorpos gerados (figura 10A) e dentro dos tratamentos ambos os grupos testes diferiram estatisticamente aos 28dpi (figura 10B). Almeida et al. (2020) ao avaliaram a dinâmica de soroconversão de animais desafiados com a cepa 232 (USA) observaram que a soroconversão se iniciou aos 14dpi e o pico máximo se deu aos 35dpi.

Respostas humorais após a infecção experimental, anticorpos IgG séricos específicos para Mhyo são detectados 3 a 4 semanas após a infecção, atingem o pico após 11 a 12 semanas e depois diminuem muito gradualmente (KOBISCH et al., 1993). Após a infecção de reforço, os títulos de anticorpos séricos aumentam claramente e depois diminuem lentamente novamente (KOBISCH et al., 1993). Curiosamente, os suínos infectados com uma cepa altamente virulenta parecem soroconverter mais cedo do que os suínos infectados com uma cepa de baixa virulência (MESSIER VILLARREAL et al., 2011). Fato este que se confirma se considerarmos classificar os isolados UFV01 como de alta ou média patogenicidade e o UFV02 como de baixa seguindo a classificação adotada por Vicca et al. (2003), pois a soroconversão do grupo UFV01 foi maior e mais precoce comparada ao grupo UFV02.

Ainda não é muito clara a relação entre os níveis de anticorpos contra Mhyo e o grau de acometimento pulmonar (GARCIA-MORANTE et al., 2017a). Um estudo conduzido por Garcia-Morante. (2017a) procurou investigar a possível associação entre diferentes parâmetros imunes humorais, tanto em nível local quanto sistêmico, com a prevalência e gravidade de lesões em suínos naturalmente e experimentalmente infectados. A nível experimental, a resposta imune humoral local foi mais forte que a sistêmica após três semanas de inoculação. Inversamente, uma vez que a resposta imune humoral sistêmica começou a aumentar em 28 dpi, revelada por um maior número de animais soropositivos e aumento das respostas IgG1 e IgG2, observou-se um declínio dos níveis de anticorpos IgG e IgA no LTB.

O IgA desempenha um papel importante na imunidade da mucosa contra patógenos infecciosos. No entanto, o mecanismo molecular da secreção de IgA, em resposta à infecção,

permanece amplamente desconhecido, particularmente em *Mycoplasma* spp. (LI et al., 2020). A IgA específica pode ser detectada em swabs nasais já aos 6 dias pós infecção e atinge o pico aos 12–16 dias e declina continuamente depois para atingir os níveis pré-ímmunes no dia 84 (MAES et al., 2021). Os níveis de IgA no soro do sangue periférico, lavado bronco alveolar, mucosa nasal, traqueia, linfonodos e tecidos pulmonares de suínos aumentaram significativamente após a infecção por Mhyo (LI et al., 2020).

Nós avaliamos o nível de anticorpos IgA dos grupos a partir do lavado traqueobrônquico pelo método padronizado por Mechler-dreibi et al. (2021). Encontramos que 100% dos animais do grupo UFV01 foram positivos na detecção de IgA, enquanto apenas 50% do grupo UFV02 foi positivo para IgA. Os indivíduos positivos para IgG sérico aos 35dpi são os mesmo suínos positivos para IgA em LTB aos 35dpi (tabela 4 e 5).

Acredita-se que o Mhyo induza respostas imunes intensas nas mucosas e que IgA de longa duração possa fornecer proteção imunológica indispensável para o organismo. No entanto, existem poucos estudos sobre o mecanismo molecular pelo qual Mhyo promove uma imunidade mucosa tão forte caracterizada pelo aumento de IgA (LI et al., 2020). A principal estratégia da imunidade da mucosa do trato respiratório é o de formar uma barreira protetora para eliminar patógenos invasores respiratórios e prevenir infecções e colonização ativa (MECHLER-DREIBI et al., 2021). O patógeno adere ao epitélio ciliado da traqueia, brônquios e bronquíolos, causa danos à mucosa, modula o sistema imunológico e torna o animal mais suscetível a outras infecções respiratórias. A patogênese é muito complexa e ainda não totalmente compreendida. As respostas humorais mediadas por células e provavelmente também pelas mucosas são consideradas importantes para a proteção, embora os animais infectados não sejam capazes de eliminar rapidamente o patógeno do trato respiratório (MAES et al., 2021)

A capacidade de aderência e multiplicação no epitélio respiratório suíno é dependente de um complexo conjunto de adesinas e estratégias imunomoduladoras que permitem ao Mhyo se estabelecer por longos períodos no trato respiratório. A quantificação bacteriana estimada tanto no swab laringeal foi crescente ao longo do tempo (figura 12 A e B), apesar de não ter sido detectado diferença estatística entre os grupos UFV01 e UFV02 quanto a carga bacteriana. Os animais inoculados com a cepa UFV01 apresentaram uma eliminação ambiental da bactéria mais precoce, pois aos 14dpi 75% dos animais (6/8) foram positivos na qPCR de swab nasal, enquanto o grupo inoculado com a cepa UFV02 apresentou uma detecção de 37,5% aos 21dpi (tabela 6)

Já as análises de qPCR para LTB, tecido e swab da lesão, o grupo UFV01 apresentou 100% (8/8) de positividade, enquanto o grupo UFV02 apresentou 87,5% (7/8), a carga bacteriana entre os grupos não teve diferença estatística ($p < 0,05$). A carga bacteriana média detectada no LTB, tecido e swab lesão foi de $3,57 \times 10^5$ cópias/ μL , $2,63 \times 10^6$ cópias / ng de DNA e $6,69 \times 10^4$ cópias/ μL , respectivamente para o grupo UFV01 e $6,32 \times 10^6$ cópias/ μL ; $3,92 \times 10^6$ cópias / ng de DNA e $7,18 \times 10^4$ cópias/ μL para o grupo UFV02. Em trabalho de Almeida et al. (2021), os quais realizaram uma infecção experimental com a cepa 232 (USA), demonstrou uma carga bacteriana médias aos 28 dpi de $2,0 \times 10^6$ cópias/ μL a partir de amostra extraídas de LTB. Pode-se observar que o valor observado pelos autores se apresentou muito próximo do encontrado em nosso trabalho.

Os dados encontrados em nosso estudo corroboram os resultados de Almeida et al., (2020), que demonstraram que a quantificação bacteriana a partir das lesões de pulmão apresentou um aumento da população do agente ao longo do tempo. Os mesmos autores não encontraram correlação entre a carga bacteriana e o grau de lesão macroscópica em seus tempos específicos de coletas. Este dado explica o fato de que em nosso estudo apesar da carga bacteriana no swab, LTB, tecido e swab de tecido terem sido estatisticamente iguais, as lesões macroscópicas e microscópicas descritas entre o grupo UFV01 e UFV02 são divergentes. Fato exemplificado por não termos encontrado correlação positiva entre as lesões macroscópicas e as respectivas cargas bacterianas presentes no LTB, tecido e swab lesão ($r^2 = 0,2438$; $r^2 = 0,0513$ e $r^2 = 0,053$). Vranckx et al. (2012) estudaram cinco rebanhos de suínos positivos para Mhyo e coletaram amostras de LTB e soro às 6, 10, 14 e 20 semanas de idade com o objetivo de correlacionar a carga bacteriana e a soropositividade com o grau de lesão no momento do abate, a nível de rebanho esta correlação não foi detectada. Os estudos de Almeida et al., (2020) (infecção experimental) e Vranckx et al. (2012) (infecção natural) corroboram a informação de que não somente a carga bacteriana presente no trato respiratório é responsável pela maior severidade das lesões pulmonares, mas que a severidade da doença é influenciada por um complexo de fatores que contribuem para manutenção apresentação clínica.

A primeira linha de defesa do sistema imune dos animais é a resposta inata, o qual é essencial para a prevenção da replicação precoce do patógeno. O Mhyo é capaz de aumentar a ativação do plasminogênio hospedeiro em plasmina via adesinas P97/102. A plasmina estimula a sinalização dos macrófagos, o que resulta em uma forte resposta inflamatória caracterizada pela presença de citocinas pró-inflamatórias locais. Além da prevenção da replicação precoce do patógeno, as respostas imunes inatas também são importantes para

moldar as respostas imunes adaptativas, que envolvem principalmente células dendríticas, pois servem como células apresentadoras de antígenos para células T virgens que são capazes de direcionar o tipo de resposta imune (BEUCKELAERE et al., 2022).

A produção de citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas ao desenvolvimento de lesões características da PES (OKAMBA et al., 2010; JORGE et al., 2014; MUNETA et al., 2008). Desta forma se faz necessária a avaliação do envolvimento das citocinas pró e anti-inflamatórias envolvendo a infecção pelo Mhyo, sendo assim avaliadas as concentrações no soro através de kits de ELISA comerciais para IL-10, IFN gamma e TNF alpha nos tempos de coleta 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dpi. Não foi detectado a presença de IFN gamma, possivelmente sua concentração estava abaixo do limiar de detecção do teste. Já o TNF alpha diferiu estatisticamente entre os grupos no dia 28dpi, o qual os animais inoculados com a cepa UFV02 apresentaram níveis maiores do que o grupo UFV01. Já a citocina IL-10 não diferiu estatisticamente entre os grupos. Almeida et al. (2020) em seu trabalho para elucidar a dinâmica de expressão das citocinas ao longo da infecção pelo Mhyo por meio de expressão gênica do tecido pulmonar, determinaram que o INF- γ é negativamente correlacionado com o escore de lesão macroscópica, indicando que quanto maior a expressão de INF- γ menores são as lesões macroscópicas. Apesar de nossa técnica de detecção diferir de Almeida et al. (2020), em nosso resultado não foi possível estimar a presença de INF- γ sérico.

O grupo 2 apresentou maior TNF- α em relação ao controle. Esta citocina faz parte da imunidade inata e é produzida pelos macrófagos e monócitos, sua expressão *in vitro* já foi correlacionada a ativação de receptores *Toll like 2* e 6. O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória envolvida na secreção de proteínas de fase aguda e é frequentemente detectada em suínos infectados por Mhyo (FOUOUR et al., 2019).

Redondo et al. (2009) detectaram por imuno-histoquímica aumento da expressão de TNF- α em suínos infectados experimentalmente de 7 a 28dpi. Lorenzo et al. (2006) encontraram durante todo seu estudo pela técnica de imuno-histoquímica que os níveis de TNF- α aumentaram significativamente no exsudato do tecido pulmonar de suínos infectados em relação aos controles. Já Choi et al. (2006) detectaram por RT-PCR aumento crescente de TNF- α a partir de 1 semana após infecção, antes da ocorrência de alterações patológicas do tecido, alcançando pico máximo aos 21dpi e decresceu constantemente até 35dpi, e Almeida et al. (2020) detectaram por RT-PCR aumento da expressão de TNF- α aos 14dpi, sendo suprimida sua expressão em todos os dias posteriores analisados. O consenso entre os trabalhos que analisaram esta citocina e de que ela desempenhe um papel no acúmulo de células inflamatórias no tecido pulmonar contribuindo para formação das lesões, porém seu

momento preciso em que corre seu pico de expressão e decréscimo ainda não foi bem elucidado.

Pode ser observado dois pontos importantes entre os grupos. No grupo UFV01 o animal que alcançou maior grau de acometimento pulmonar veio a óbito, as únicas alterações dignas de nota encontradas em sua necropsia aos 35dpi, foram lesões pulmonares primárias e secundárias, sendo assim o grupo apresentou uma taxa de mortalidade de 12,5%. Já o grupo UFV02 teve um animal que mesmo sendo inoculado de forma semelhante aos outros, o mesmo não desenvolveu a PES, apresentando-se negativo durante todo o estudo para detecção do agente. Ambas as informações corroboram que há diferença de patogenicidade entre os grupos, sendo o UFV01 potencialmente mais patogênico. Apesar dos dados apresentados em nosso estudo, ainda se fazem necessárias mais pesquisas para aprofundarmos o entendimento e comportamento destes dois isolados *in vivo*.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As cepas UFV01 e UFV02 foram capazes de reproduzir a doença clínica com um desafio experimental avaliado por 35 dias pós-infecção. No entanto, a cepa UFV01 demonstrou maiores indicadores de determinados parâmetros observados em comparação com a cepa UFV02. Uma vez que foi possível observar maiores níveis de lesões micro e macroscópicas, produção de anticorpos da classe IgG em animais inoculados com a cepa UFV01. Adicionalmente, foi observada a mortalidade de 12,5% (1/8) induzida pela cepa UFV01. A cepa UFV01 também apresentou uma porcentagem de excreção mais precoce do que os animais inoculados com a cepa UFV02.

Após a completa análise dos dados obtidos e da revisão de literatura é possível inferir que a cepa UFV01 potencialmente se trata de um isolado de maior patogenicidade quando comparado a cepa UFV02. Porém mais estudos são necessários para elucidar as diferenças genéticas e suas apresentações fenotípicas.

Com esta padronização de um modelo de infecção experimental em modelo suíno e com a caracterização da virulência dos isolados deste trabalho, novos ensaios podem surgir para pesquisar os mecanismos de patogenia do Mhyo. Novos estudos para o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnósticos e protocolos terapêuticos possam ser beneficiados com os resultados deste trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ABPA- Associação Brasileira de Proteína Animal, Relatório anual. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2022/>. Acesso em 25/11/2022.

ALMEIDA, H. M. S. et al. Cytokine expression and *Mycoplasma hyopneumoniae* burden in the development of lung lesions in experimentally inoculated pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 244, n., p. 108647, 2020.

ALMEIDA, H. M. S. et al. Dynamics and chronology of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232 infection in experimentally inoculated swine. **Porcine Health Management**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2021.

ARENALES, A. et al. Histopathologic patterns and etiologic diagnosis of porcine respiratory disease complex in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, n. 3, p. 497–508, 2022.

ASSAO, V. S. et al. Correction to: Genetic variation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from Brazilian field samples. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019.

BARALDI, T. G. et al. Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and influenza virus and their relationships with risk factors, clinical signs and lung lesions in pig farms with one-site production systems in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 171, p. 104748, 2019.

BAI, F. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* derived lipid associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 155, n. 3, p. 155–161, 2013.

BEUCKELAERE, L. et al. Different local, innate and adaptive immune responses are induced by two commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and an adjuvant alone. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1–16, 2022.

BETLACH, A. M. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: Current trends and proposed terminology for genomic classification. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 5, p. 1840–1854, 2019.

BOGEMA, D. R. et al. Characterization of Cleavage Events in the Multifunctional Cilium Adhesin Mhp684 (P146) Reveals a Mechanism by Which *Mycoplasma hyopneumoniae* Regulates Surface Topography. v. 3, n. 2, p. 1–11, 2012.

BONIFAIT, L. et al. Detection of *Streptococcus suis* in bioaerosols of swine confinement buildings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3296–3304, 2014.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M.; OSTROWSKI, L. E. Cilia and mucociliary clearance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 4, 2017.

CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C. Colonization state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. **Veterinary Record**, v. 146, n. 18, p. 530–532, 2000.

CALUS, D et al., Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. **Journal of Microbiological Methods**, 83: 335–340, 2010.

CHAE, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Journal**, v. 212, p.1-6, 2016.

CHARLEBOIS et al., Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. **Veterinary Microbiology**, v.168, p.348-356, 2014.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 493–499, 1999.

CHOI, C. et al. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 1, p. 40–46, 2006.

COOK, B. S. et al. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 158–164, 2016.

CZAJA, T. et al. Induction of enzootic pneumonia in pigs by the administration of an aerosol of in vitro-cultured *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Record**, v. 150, n. 1, p. 9–11, 2002.

DE CONTI, E. R. et al. Agents of pneumonia in slaughtered pigs in southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 41, 2021.

DEENEY, A. S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages in vitro. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 1–15, 2019.

DING, H. et al. Development of an ELISA for distinguishing convalescent sera with *Mycoplasma hyopneumoniae* infection from hyperimmune sera responses to bacterin vaccination in pigs. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 5, p. 1831–1840, 2021.

DOS SANTOS, L. F. et al. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 2–4, p. 374–381, 2015.

FELDE, O. et al. Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates from Central Europe for fifteen antibiotics by microbroth dilution method. **Plos One**, v. 13, p. 1–13, 2018b.

FELDE, O. et al. Genotyping *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates based on multi-locus sequence typing, multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and analyzing gene p146. **Veterinary Microbiology**, v. 222, n. July, p. 85–90, 2018a.

FERRAZ, M. E. S. et al. Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. **Preventive Vet Medi**, v. 182, p. 105091, 2020.

FOUCHIER, R. A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences, 2000.

FOUROUR, S et al., A new multiplex real-time TaqMan® PCR for quantification of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis* and *M. flocculare*: exploratory epidemiological investigations to research mycoplasmal association in enzootic pneumonia-like lesions in slaughtered pigs. **J. Appl. Microbiol.** v.125, p. 345–355, 2018.

FOUROUR, S. et al. Intra-Species and Inter-Species differences in Cytokine Production by Porcine Antigen-Presenting Cells Stimulated by *Mycoplasma Hyopneumoniae*, *M. Hyorhinitis*, and *M. Flocculare*. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2019.

GARCIA-MORANTE, B. et al. Potential use of local and systemic humoral immune response parameters to forecast *Mycoplasma hyopneumoniae* associated lung lesions. **Plos one**, v. 12, n. 4, p. 1–14, 2017a.

GARCIA-MORANTE, B. et al. Determinants for swine mycoplasmal pneumonia reproduction under experimental conditions: A systematic review and recursive partitioning analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–16, 2017b.

GARCIA-MORANTE, B. et al., Induction of mycoplasmal pneumonia in experimentally infected pigs by means of different inoculation routes. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1–10, 2016.

GALDEANO, J. V. B. et al. Cross-sectional study of seropositivity, lung lesions and associated risk factors of the main pathogens of Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC) in Goiás, Brazil. **Porcine Health Management**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2019.

GARCIA-MORANTE, B. et al. Improving *Mycoplasma hyopneumoniae* diagnostic capabilities by harnessing the infection dynamics. **Veterinary Journal**, v. 288, n. July, p. 105877, 2022.

GALLI et al. Immunization of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. **Vaccine**. v. 31, p. 135-140, 2012.

GAUTIER-BOUCHARDON, A.V. Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. I **Microbiology Spectrum**, v. 6, p. 1–21, 2018.

GARZA-MORENO et al., Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 219, p. 23–29, 2018.

GILLESPIE, T. Mycoplasma infection costs in a naïve population. Allen D. Lemam **Swine Conference**, p. 51, 2013.

GONZAGA, N. F. et al. antimicrobial susceptibility and genetic profile of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 377–384, 2020.

GOECKE, N. B. et al. Development of a high-throughput real-time PCR system for detection of enzootic pathogens in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 32, n. 1, p. 51–64, 2020.

HADEN, C. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. In: 43st **Annual Meeting** of the American Association of Swine Veterinarians. Denver, Colorado, 2012. p. 75-76.

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, n. 2–3, p. 120–131, 2010.

HAKIMI, K. et al., Significant Roles Played by IL-10 in Chlamydia Infections. **Inflammation** v.24, p. 128-133, 2014.

HAN, Jemin et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain KM014, a clinical isolate from South Korea. **American Society for Microbiology**, 2017.

HAN, Q. et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Haemophilus parasuis* in tissue samples. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 4, p. 894–900, 2020.

JORGE, S et al., The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, p. 229-36, 2014.

KAMMINGA, T. et al. Metabolic modeling of energy balances in *Mycoplasma hyopneumoniae* shows that pyruvate addition increases growth rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2339–2347, 2017.

KOBISCH, M. et al., Swine mycoplasmoses. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*, v. 15, p. 1569-1605, 1996.

KOBISCH M. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res.* 1993; 24:67–77

KOKOTOVIC, B. et al. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3300–3307, 1999.

KURAMAE-IZIOKA . A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* for RAPD. *Rev. Unimar* 19, 683–689, 1997.

- KWON, D., CHOI, C., CHAE, C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 584–587, 2002
- LEAL ZIMMER, F. M. A. et al. Pathogenicity & virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 1600–1622, 2020.
- LIU, W. et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 4, p. 1016–1017, 2011.
- LIU, W. et al. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma hyopneumoniae* pathogenic 168 strain and its high-passaged attenuated strain. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.
- LI, X. et al. Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Mediate the IgA Immune Response Induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*. v. 88, n. 1, p. 1–15, 2020.
- LORENZO, H. et al. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3–4, p. 199–207, 2006.
- MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297–309, 2008.
- MAES, M. et al. Enzootic Pneumonia in Pigs, **Vet. Quat.**, v. 18, p. 104–109, 1996.
- MAES, D. et al., Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. *transboundary and emerging diseases*, v. 65, p. 110–124, 2017.
- MAES, D. et al. Perspectives for improvement of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in pigs. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 1–20, 2021.
- MARCHIORO et al., Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. **Vac.** v.18, p.31, 2013.
- MALMSTEN, A. et al. A serologic survey of pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sweden. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 2, p. 229–237, 2018.
- MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 96–104, 2007.
- MAROIS, C. et al. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3–4, p. 283–291, 2009.
- MECHLER-DREIBI, M. L. et al. Oral vaccination of piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae* using silica SBA-15 as an adjuvant effectively reduced consolidation lung lesions at slaughter. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

MEYNS, T. et al. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p.

MESSIER, S., Ross, R.F., 1991. Interactions *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. **Am J Vet Res.** 52, 1497–1502.

MINION, F. C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7123–7133, 2004.

MUNETTA, Y. et al. Immune response of gnotobiotic piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 10, p. 1065–1070, 2008.

NI, B. et al. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 11429–11443, 2015.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/190/> .Data de acesso: 27/12/2022.

OKAMBA et al., Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **Vaccine.**, v.28, p.4802-4809, 2010.

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

PIETERS, M. G., MAES D. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J. (Ed 11.), Diseases of Swine. **Iowa State University Press**, Ames, Iowa, USA, p. 863–871. 2020.

QIU, G. et al. Identification and genomic analysis of a pathogenic strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* (tb1) isolated from Tibetan pigs. **DNA and Cell Biology**, v. 38, n. 9, p. 922–932, 2019.

RAYMOND, B.B.A. & DJORDJEVIC, S. Exploitation of plasminogen by bacterial pathogens of veterinary significance. *Veterinary Microbiology*, 178: 1–13. 2015.

REDONDO, E. et al. Histopathological and Immunohistochemical Findings in the Lungs of Pigs Infected Experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, n. 4, p. 260–270, 2009.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

ROOS, L. R. et al. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. **Veterinary Microbiology**, v. 184, p. 51–58, 2016.

- RYCROFT, A. In: Maes, D. (Ed. 1), *Mycoplasmas in swine*. **Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium**, p. 27. 2019.
- SALLING, H.K. & CHRISTENSEN, S.R.B. Multi-primer qPCR assay capable of highly efficient and specific detection of the vast majority of all known *Mycoplasma*. **Biolog**, p.1-10, 2016.
- SHEN, Y. et al. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* on porcine nasal cavity dendritic cells. **Veterinary Microbiology**, v. 198, p. 1–8, 2017.
- SIQUEIRA, F. M. et al. Unravelling the transcriptome profile of the swine respiratory tract *mycoplasmas*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–12, 2014.
- SIQUEIRA, F. M. et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2013.
- SIBILA, M. et al. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 165–170, 2008.
- SILVA, A. P. S. P. et al. Cough associated with the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in clinical and environmental specimens under controlled conditions. **Porcine Health Management**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2022.
- SIBILA, M. et al. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Vet J.**, v. 181, n. 3, p. 221-31, 2009.
- SIMIONATTO et al., Immunological characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v.35, p.209-216, 2012.
- SIMIONATTO et al., *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. **Veterinary Microbiology**. v. 30, p.234-42, 2013.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. pp 216-217. 2012.
- SOLTANI, S. et al. Prevalence of virulence genes and their association with biofilm formation in VRE faecium isolates from Ahvaz, Iran. *J Infect Dev Ctries* 12:970–977, 2018.
- SOSA, C. et al. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Mendoza province. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 51, n. 3, p. 229–233, 2019.
- STAKENBORG, T. et al. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1–2, p. 29–36, 2005.
- STRAW, B.E et al., Examination of swine at slaughter. Part II. Findings at slaughter and their significance. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 8, p. 106–112, 1986.
- SUMMERFIELD, A. In: Maes, D. (Ed. 1), *Mycoplasmas in swine*. **Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium**, p. 110-125. 2020.

SUNAGA, F. et al. Development of a one-run real-time pcr detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 82, n. 2, p. 217–223, 2020.

TAKEUTI, K. L. et al., O que há de novo sobre a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. *Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos II*, Tabela v.1, p. 111–118, 2017.

TAKEUTI, K. L. et al. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. **Veterinary Microbiology**, v. 208, n. March, p. 18–24, 2017.

TAO, Y. et al. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Research in veterinary science**, v. 123, n. January, p. 144–152, Apr. 2019.

TRACKER, E.L., MINION, F.C. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J. (Ed.), *Diseases of Swine*. **Iowa State University Press**, Ames, Iowa, USA, p. 779–797. 2010.

TRUEEB, B. S. et al. Tn-sequencing of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* mutant libraries reveals non-essential genes of porcine mycoplasmas differing in pathogenicity. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 2019.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. Swine and poultry pathogens: The complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5568–5577, 2005.

VICCA, J. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 3–4, p. 177–190, 2003. 87–95, 2003.

VICENTE et al., Seropositivity for *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs at a slaughterhouse in the central region of São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.65 n.6, 2013.

VILLARREAL et al., Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **Vac.**, v. 29 p.1731–1735, 2011.

VILLARREAL et al., Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. **BMC Vet. Res.**v.8, 2012.

VRANCKX, K. et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 2020–2023, 2011.

VRANCKX, K. et al. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3–4, p. 315–321, 2012.

WOOLLEY, L. K. et al. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of

mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 1–2, p. 186–195, 2012.

WU, Y. et al. Genotyping and biofilm formation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and their association with virulence. **Veterinary research**, v. 53, n. 1, p. 95, 2022.

YU, Y. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades complement activation by binding to factor H via elongation factor thermo unstable (EF-Tu). **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 1059–1074, 2020.

XIE, Xing et al. Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Flavin Oxidoreductase of *Mycoplasma hyopneumoniae* Functions as a Potential Novel Virulence Factor and Not Only as a Metabolic Enzyme. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 747421, p. 1–14, 2021.

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

APÊNDICE A

Tabela S A: Eficiência das curvas padrões diluídos para as análises de qPCR.

Fluor	Eficiência %	Slope	Y-Intercept	R ²
FAM	101,73	-3,281	42,733	1,000
FAM	101,22	-3,293	42,596	0,997
FAM	98,62	-3,355	43,682	1,000
FAM	99,22	-3,341	43,858	0,993
FAM	101,46	-3,287	43,020	0,994
FAM	99,96	-3,323	43,631	0,998

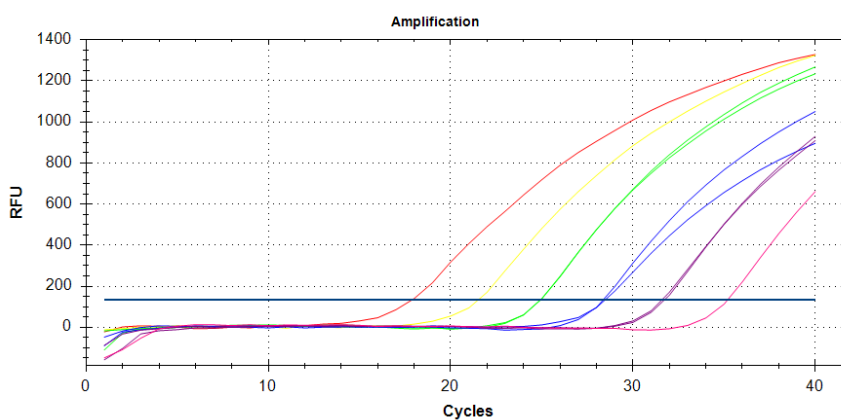


Figura S A: Curva padrão de qPCR para Mhyo gerado pelos valores 10^7 até 10^2 moléculas/ μL em duplicatas.

APÊNDICE B

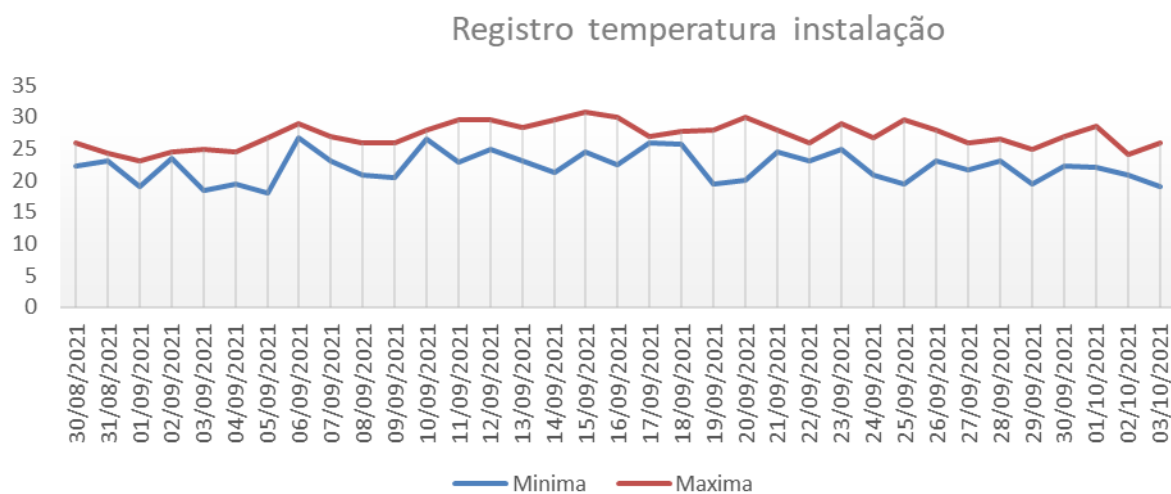


Figura S B: Registro diário da temperatura em graus celsius da temperatura da instalação durante o período experimental.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
 PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
 Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900- Telefone: (31) 3612 2315

Viçosa, 23 de julho de 2021

Profa.
 Abelardo Silva Júnior
 Coordenador do projeto
 DVT/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “Projeto de infecção experimental em modelo suíno com novo isolado (UFV 01) de *Mycoplasma hyopneumoniae*”, aqui nomeado Processo 39/2021, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados:
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:
Inscrição em CRMV:

Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
 Coordenadora
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 39/2021, intitulado “**Projeto de infecção experimental em modelo suíno com novo isolado (UFV 01) de *Mycoplasma hyopneumoniae***”, coordenado pelo professor Abelardo Silva Júnior do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 23/07/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 39/2021, named “**Experimental infection project in a swine model with a new isolate (UFV 01) of *Mycoplasma hyopneumoniae***”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTIC therefore being approved by the Committee on July 23, 2021 valid for 12months.



Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV