

FLÁVIA COELHO RIBEIRO

**DIAGNÓSTICO DE PNEUMONIA ENZOÓTICA PELA TÉCNICA DE
IMUNOPEROXIDASE EM SUÍNOS NATURALMENTE
INFECTADOS**

Tese 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*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

**Problemas para vencer, liberdade para provar e, enquanto acreditarmos em
nossos sonhos, nada é por acaso.**

(Henfil)

AGRADECIMENTO

Antes de tudo, a Deus, que permitiu que eu completasse mais uma importante etapa na minha vida.

A Nossa Senhora, que me deu o seu colo de mãe nas horas em que mais precisei.

A minha amada mãe Ruth e irmão Rodrigo, que são os alicerces da minha vida.

Aos meus padrinhos Célia e Silvio por todo amor e atenção ao longo de minha vida.

As minhas queridas tias Stella e Perilla por todo carinho e apoio que foram essenciais para o cumprimento desta realização.

A meu padrasto Jorge pela amizade e apoio.

A meu pai Raimundo pela amizade e carinho.

Ao Philipp por todo o carinho e amizade que me ajudaram a superar as horas difíceis.

A minha querida prima Paula, que sempre tomei como exemplo.

As minhas queridas amigas Angela, Tatiana e Lea, que rezaram e torceram pelo meu sucesso.

Ao professor João Carlos Pereira da Silva, pelo aprendizado, dedicação e amizade.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilorio pela amizade e conselhos que tanto me auxiliaram.

Ao professor José Lúcio dos Santos pela amizade, sugestões e apoio.

Ao professor Joaquín H. Patarroyo Salcedo pela amizade, dedicação e auxílio nos momentos difíceis de realização das técnicas.

Ao Dr. Nelson Mores por todo apoio, pelo soro e pelas valiosas sugestões que foram cruciais para o cumprimento do presente trabalho.

Ao professor Alfredo Barbosa da Faculdade de Medicina da UFMG, que possibilitou a realização do treinamento nas técnicas de imunohistoquímicas.

A querida amiga Kelly pela convivência e cooperação na fase experimental deste trabalho.

Aos funcionários Cláudio, Adão, Aline e Márcio, que, no laboratório tanto me apoiaram.

A minhas queridas amigas e irmãs de coração Daniele, Emília, Elisa e Márcia pelo dia-a-dia de sincera amizade e companheirismo.

Aos meus colegas de curso Teresa, Jorge, Daniela, Cláudia, Michele, Mayra, Ramon e Policarpo pela amizade que tanto contribuiu para a realização deste trabalho.

A minhas queridas amigas Cassiana e Flávia pela amizade e carinho.

Aos amigos do grupo de oração Imaculado Coração de Maria por terem me acolhido nas horas de dificuldade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária pelo apoio.

Ao Frigorífico Saudali pela possibilidade de obtenção do material.

Ao CNPq e à Universidade Federal de Viçosa pelo apoio financeiro e estrutural indispensáveis para o cumprimento deste trabalho.

Principalmente, a todos os obstáculos que enfrentei, que tornaram esta vitória ainda maior.

BIOGRAFIA

Flávia Coelho Ribeiro, filha de Ruth Maria Balthazar Coelho e Raimundo Alves Ribeiro, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, em 04 de maio de 1976.

Em 1995, iniciou o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense. Foi bolsista de iniciação científica pela Fundação Estadual do Norte Fluminense no Laboratório de Imunogenética, concluindo a sua graduação em janeiro de 2000.

Em fevereiro de 2000, ingressou no Curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xiii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3.REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Histórico.....	5
3.2. Etiologia	6
3.3. Patogenia	7
3.4. Sinais Clínicos	13
3.5. Lesões	14
3.6. Diagnóstico	15
3.6.1. Lesões ao Abate	15
3.6.2. Cultivo	17
3.6.3.Técnicas de Sorodiagnóstico	18
3.6.3.1.Hemaglutinação Indireta.(IHA)	18

3.6.3.2. Teste de Fixação de Complemento.(FC)	19
3.6.3.3. Teste de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	20
3.6.3.4. Reações Cruzadas	21
3.6.4. Técnicas Moleculares	21
3.6.4.1. Hibridização <i>in situ</i>	22
3.6.4.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	23
3.6.5. Imunohistoquímica	24
3.6.5.1. Imunofluorescência	24
3.6.5.2. Imunoperoxidase	25
3.7. Impacto Econômico	26
3.8. Tratamento e Controle	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

RIBEIRO, Flávia Coelho, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002.
Diagnóstico de Pneumonia Enzoótica pela Técnica de Imunoperoxidase em Suínos Naturalmente Infectados. Orientador: João Carlos Pereira da Silva.
Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilorio e José Lúcio dos Santos.

Com o objetivo de avaliar a utilização da técnica da imunoperoxidase como método auxiliar para a detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmão de suínos naturalmente infectados, foram colhidos 80 fragmentos de pulmão, sendo 40 de animais provenientes de granjas consideradas negativas e 40 de granjas com diagnóstico positivo para pneumonia enzoótica. Os resultados obtidos com a utilização de soro policlonal específico (IgG de coelho anti- *M. hyopneumoniae*) demonstraram uma correlação positiva de 77% entre os diagnósticos microscópicos e imunohistoquímicos, enquanto a correlação entre os diagnósticos macroscópicos e imunohistoquímicos foi inferior, equivalendo a 49%. Nas granjas negativas observou-se a presença de discreta imunorreação em 22,5% dos casos, o que poderia indicar a existência de reação cruzada com outros microrganismos. Já nas granjas com diagnóstico positivo para pneumonia enzoótica, a técnica da Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) revelou diferentes graus de intensidade de imunomarcção, variando de discreto até espesso depósito amarronzado no epitélio ou na luz das vias

aéreas, ou ainda no interior de macrófagos, com uma relação direta entre a intensidade das lesões morfológicas e da imunomarcação. Verificou-se ainda que a técnica imunohistoquímica possui sensibilidade de 95% e especificidade de 77,5%, podendo a mesma ser recomendada como ferramenta auxiliar, rápida e de baixo custo, para o diagnóstico da pneumonia enzoótica suína em laboratórios de rotina em histopatologia.

ABSTRACT

RIBEIRO, Flávia Coelho, Universidade Federal de Viçosa, February de 2002.
Diagnosis Of Enzoitic Pneumonia With The Imunoperoxidase Technique In Naturally Infected Swine. Adviser: João Carlos Pereira da Silva. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilorio e José Lúcio dos Santos.

The aim of this work is to evaluate the use of the imunoperoxidase technique as a supporting method for the detection of the *Mycoplasma hyopneumoniae* in the lungs of naturally infected swine. For this purpose, 80 lung fragments were collected - 40 of animals from pig farms considered to be "negative" and 40 of animals from pig farms with positive diagnosis of enzootic pneumonia. The results obtained with the use of specific policlonal serum (rabbit anti *M. hyopneumoniae* IgG) show a positive correlation at the rate of 77% between the microscopical and imunohistochemical diagnoses, whereas correlation between macroscopical and imunohistochemical diagnoses occurred at the lower rate of 49%. In the "negative" farms, discrete immunereaction was observed in 22.5% of cases, which could point to cross reaction with other microorganisms. In the other hand, in the farms with positive diagnosis for enzootic pneumonia, the peroxidase-anti-peroxidase technique (PAP) showed different grades of intensity of immunomarking. It was also observed that the imunohistochemical technique has 95% sensitivity and 77.5% specificity.

This would enable this technique to be a recommendable fast and cost-effective supporting tool for the diagnosis of enzootic pneumonia in routine laboratories
Histopathology.

1- INTRODUÇÃO

A pneumonia enzoótica suína é uma doença altamente contagiosa, de distribuição cosmopolita, caracterizada por alta morbidade, baixa mortalidade, tosse crônica, crescimento retardado, sendo considerada uma das principais causas de perda econômica na suinocultura. Tem como principal agente etiológico o *Mycoplasma hyopneumoniae* e é frequentemente exacerbada por agentes secundários, destacando-se entre eles a *Pasteurella* e alguns cocos.

O agente dessa patologia se dissemina rapidamente sob condições ambientais favoráveis e é comumente observada em suínos nas fases de crescimento e terminação. Práticas inadequadas de manejo, incluindo alta densidade, falta de higiene das instalações e fatores ambientais associados, como ventilação inadequada, podem aumentar as concentrações de contaminantes aéreos, o que potencializa os impactos da pneumonia suína.

Além dos gastos com tratamento e programas de vacinação, os prejuízos que recaem sobre o rebanho se traduzem por debilidade do animal, diminuição do ganho de peso diário, diminuição da eficiência alimentar, variação do crescimento e aumento do tempo para o abate.

O agente da pneumonia enzoótica é bastante disseminado nas criações de suínos brasileiras e, sua presença determina sério comprometimento no desempenho do rebanho, tornando imprescindível a adoção de medidas profiláticas e de controle. Diante da natureza, da especificidade e da complexidade de fatores envolvidos com essa patologia, o diagnóstico rápido e preciso da pneumonia enzoótica e sobretudo do(s) agente(s) etiológico(s)

envolvido(s) passa a ser imperativo. Graças às características singulares dessa enfermidade, o diagnóstico presuntivo pode ser realizado pela conjunção dos sinais clínicos e dos aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões. Todavia, esse procedimento traz em seu bojo uma parcela de subjetividade e de imprecisão, sendo necessários exames complementares para a confirmação do diagnóstico. A fim de dirimir eventuais controversas sobre a etiologia do processo, muitas vezes o cultivo e o isolamento do agente tornam-se necessários. No entanto, por tratar-se de um microorganismo de caráter fastidioso, de crescimento lento e que requer meio seletivo, complexo e de alto custo para seu crescimento, as técnicas de isolamento não são rotineiramente utilizadas. Além disso, a utilização de antibióticos e outros quimioterápicos na alimentação pode também mascarar e comprometer os resultados desse procedimento microbiológico (Done,1996).

As técnicas sorológicas, dentre elas o teste imunoenzimático “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA), possuem uma alta sensibilidade, mas, devido à ocorrência de reações cruzadas com o *Mycoplasma flocculare*, possuem limitações quanto a sua utilização. Além disso, os métodos sorológicos detectam os títulos de anticorpos, mas não confirmam a ocorrência de uma infecção.

A imunofluorescência foi ocasionalmente utilizada para o diagnóstico de pneumonia enzoótica por ser barata, simples e prática. Contudo, existem restrições ao seu uso, uma vez que requer amostras recentes do material a ser examinado e microscópio de luz ultravioleta, que tem custo elevado. Além disso, a sua revelação não é duradoura, pois desaparece logo que é excitada pela luz ultravioleta.

Os inconvenientes das técnicas já citadas estimulam a busca de métodos compatíveis com os processos diagnósticos de rotina. Adicionalmente, em determinadas circunstâncias, torna-se necessária a utilização de técnicas que possuam alta especificidade capazes de detectar, de forma insofismável, determinantes antigênicos envolvidos com a gênese do processo mórbido. Noutras situações, a sensibilidade do método diagnóstico pode vir a ser importante ferramenta capaz de monitorar o estado de higidez de um rebanho e detectar um possível início da doença antes mesmo que ela se manifeste.

Nesse contexto, a imunohistoquímica (IHQ), ao combinar técnicas morfológicas, imunológicas e bioquímicas, desponta como instrumento promissor para o diagnóstico de agentes infecciosos. Esta técnica utilizando a enzima peroxidase, peroxidase anti-peroxidase (PAP) como molécula marcadora é facilmente exeqüível, de metodologia simples e possui, dentre outras vantagens, a rapidez, o baixo custo e a durabilidade do material corado.

A despeito da grande perspectiva, verifica-se na literatura compulsada, que a utilização da imunohistoquímica como método auxiliar no diagnóstico da pneumonia micoplásmica suína merece considerações adicionais.

Diante desse quadro, resolveu-se avaliar a técnica da imunoperoxidase, como instrumento complementar para o diagnóstico de pneumonia enzoótica em suínos.

2- OBJETIVOS

- Padronizar os procedimentos necessários para se estabelecer uma rotina de diagnóstico para a pneumonia enzoótica, utilizando a técnica da imunoperoxidase Peroxidase anti-peroxidase (PAP).

- Verificar a sensibilidade e especificidade do método para o diagnóstico da doença.

- Verificar a eficiência desta técnica para o monitoramento de pneumonia enzoótica em criações de suínos.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Histórico

Em 1931, SHOPE, em sua clássica descrição de influenza suína, reconheceu uma outra doença respiratória de caráter crônico, posteriormente confirmada como pneumonia enzoótica. Anos depois, em 1948, PULLAR observou que aquela doença crônica diferente da influenza era de caráter transmissível, mas ainda não se sabia sua etiologia.

Em 1952, BETTS verificou que o agente etiológico da enfermidade ficou retido em filtros bacterianos. Pensando se tratar de um grande vírus, denominou a doença "pneumonia virótica dos suínos".

Já em 1963, GOODWIN e WHITTLESTONE designaram essa doença como "pneumonia enzoótica dos suínos", devido a sua transmissão muito comum ou "enzoótica" nas populações de suínos e também porque não tinha sido comprovada a sua etiologia viral.

Em 1964, MARE e SWITZER observaram que o agente crescia em meio livre de células e apresentava-se de forma cocóide à cocóide-bacilar, pela coloração de Giemsa. Verificaram que o agente media de 110 a 220 nm de diâmetro e que era sensível a clortetraciclina e resistente à penicilina. Concluíram se tratar de um micoplasma e denominaram-no de *Mycoplasma hyopneumoniae* (OBOEGBULEN, 1981).

3.2- Etiologia

O principal agente etiológico da pneumonia enzoótica dos suínos é o *Mycoplasma hyopneumoniae* (MARE e SWITZER, 1964 citado por OBOEGBULEN, 1981). Segundo ROSENBUSCH (1994), este agente pertence à classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae, gênero *Mycoplasma* e espécie *Mycoplasma hyopneumoniae*. De acordo com DE ROBERTIS e DE ROBERTIS JR (1993), esse microorganismo é tão pequeno que seu tamanho corresponde ao de um grande vírus. Trata-se de uma bactéria com cerca de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro, que passa, em função disso, através de poros de membranas filtrantes com diâmetro de até 0,45 μm (MAES et al., 1996). LORDEN (2000) acredita que possa ser uma subclasse de bactéria.

Diferente das bactérias típicas, o *Mycoplasma hyopneumoniae* não possui parede celular, pois carece de mecanismos genéticos para formá-la, sendo por isso considerado um microorganismo gram-negativo. Devido à ausência da parede celular, esses microorganismos são resistentes aos antibióticos do grupo das penicilinas, os quais interferem na sua síntese. Por outro lado, são sensíveis às drogas que impedem o metabolismo de aminoácidos, de ácidos nucleicos e de esteróides e às condições ambientais, a pressão osmótica e aos detergentes comuns (YAMAMOTO, 1994; MAES et al., 1996).

A membrana plasmática dos micoplasmas é constituída de glicoproteínas, glicolipídeos e fosfolipídeos. Esse agente possui genoma completo e circular que o diferencia dos vírus, sendo considerado como o de menor peso entre os procariontes com capacidade de auto-replicação (YAMAMOTO, 1994; MAES et al. 1996).

Usualmente requerem uma íntima associação com a superfície de células epiteliais, além de exigirem um meio complexo para o seu crescimento *in vitro* (ROSENBUSCH, 1994). Seu crescimento é lento, possibilitando o desenvolvimento concomitante de outros micoplasmas, sendo por isso caracterizado como um agente fastidioso e de difícil cultivo (YAMAMOTO, 1994; FRASER et al., 1997; BAUMEISTER et al., 1998; STEVENSON, 1998).

Para seu isolamento, o meio de cultura mais comumente utilizado é o descrito por FRIIS (1975) citado por STEVENSON (1998), e muitas passagens

neste meio são necessárias para a sua inoculação em ágar, onde são capazes de formar colônias com aspecto de "ovo frito" (STEVENSON, 1998). O pH ótimo para o crescimento é de 7,5 e a temperatura ideal é entre 37 a 39° C (YAMAMOTO, 1994).

Os micoplasmas são muito exigentes e, para o seu lento crescimento, necessitam de um meio completo com ácidos graxos insaturados e seus precursores (YAMAMOTO, 1994). Essa exigência se deve ao fato de possuir um reduzido genoma, o que limita a capacidade de biossíntese dos componentes necessários ao seu metabolismo. Sua obtenção de energia é realizada mediante a oxidação de ácidos graxos, necessitando, portanto, de precursores de ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos (ROSENBUSCH, 1994).

3.3- Patogenia

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é um parasita hospedeiro-específico, encontrado na mucosa respiratória, onde se adere ao epitélio ciliado da traquéia, brônquios e bronquíolos, mas não penetra no mesmo. De acordo com DONE (1996), nos primeiros estágios da infecção, há aumento do número de micoplasmas no epitélio traqueal, bronquial e bronquiolar, podendo ser encontrados também nos alvéolos. Concordando com essa assertiva, STEVENSON (1998) verificou que o *Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza o epitélio respiratório desde a cavidade nasal até os ductos aéreos. Já YAMAMOTO (1994), em estudos prévios, observou que esses agentes não são usualmente encontrados neste último local; porém, podem ser evidenciados no exsudato linfocítico ou purulento.

De acordo com LIVINGSTON et al. (1972) e UNDERDAHL et al.(1980), citados por DEBEY e ROSS (1994), o *Mycoplasma hyopneumoniae* não secreta substâncias citotóxicas "in vitro. JACQUES et al. (1992), mantendo traquéias de suíno em cultura, estudaram a colonização do *Mycoplasma hyopneumoniae in vitro* e observaram que a traquéia infectada mostrou gradativa colonização, e conseqüentes danos na superfície mucosa e, com o avançar da infecção, uma progressiva perda ciliar. Esses pesquisadores também observaram que os micoplasmas tendem a aprofundar-se nos espaços interciliares. Estes agentes se

situam no ápice do cílio, no espaço intercelular em contato com a membrana das células (MAES et al 1996). DEBEY e ROSS (1994) verificaram que o *Mycoplasma hyopneumoniae* induz extensa ciliostase e perda ciliar. Para tal faz-se necessária uma íntima associação desse agente com as células ciliadas. MAES et al. (1996) assinalaram que uma proteína citotóxica e o peróxido de hidrogênio, produzido pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, poderiam estar envolvidos na destruição dos cílios e das células epiteliais.

De acordo com STEVENSON (1998), nas infecções micoplásmicas, há excessiva produção de muco pelas células do epitélio respiratório, o que causa disfunção da barreira muco-ciliar com conseqüente redução da eliminação de partículas inaladas. Segundo YOUNG et al. (2000), a diminuição da função muco-ciliar é um dos principais fatores relacionados com o aumento de infecções secundárias associadas ao *Mycoplasma hyopneumoniae*. LAMB et al. (1968) e REID et al. (1983) citados por DEBEY et al. (1992), constataram que o *Mycoplasma hyopneumoniae* produz peróxido de hidrogênio, que provocaria uma irritação local das células mucosas. Além disso, outros mediadores inflamatórios liberados pela resposta imune do hospedeiro contribuem para a progressão da lesão. DEBEY et al. (1992) estudando os efeitos da ação do *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre as características histoquímicas das mucinas respiratórias, constataram aumento destas nas células caliciformes bronquiais, o que poderia ser reflexo da produção alterada de glicoproteína em resposta à infecção.

ZIELINSKI et al. (1993), DONE (1996), MAES et al. (1996) observaram que a aderência é uma condição necessária para o início da doença, pois a ligação do *Mycoplasma hyopneumoniae* às células de revestimento leva ao dano ciliar e à descamação epitelial, causando perda da defesa mucociliar e predispondo à invasão secundária. De acordo com os experimentos de ZIELINSKI et al. (1993), essa aderência é facilitada pela existência de proteínas e carboidratos na superfície dos micoplasmas. Uma alta polarização local pode ser evidenciada, indicando a possível existência de ligações estéreo-específicas entre a adesina do micoplasma e seu receptor nas células hospedeiras. ZANG et al. (1994) analisaram os receptores glicolipídicos para a aderência do *Mycoplasma*

hyopneumoniae e observaram que este agente se liga especificamente a três glicolípídeos do cílio, identificados como La, Lb e Lc, com mais forte afinidade por este último. Acredita-se que todos os três receptores sejam glicolípídeos sulfatados, uma vez que ZIELINSKI et al. (1993) e ZANG et al. (1994) demonstraram que a ligação do micoplasma aos receptores La, Lb e Lc foi parcialmente inibida por compostos sulfurosos. DEBEY e ROSS (1994) descreveram recentemente que os anticorpos específicos inibem a aderência do *Mycoplasma hyopneumoniae* ao epitélio ciliado dos suínos, todavia MAES et al. (1996) observaram que os anticorpos presentes no soro de suíno convalescente diminuíram a perda ciliar, mas não a colonização, concluindo-se que os anticorpos protegem contra os danos ciliares, mas não bloqueiam a aderência. ZANG et al. (1995) identificaram e caracterizaram uma adesina do *Mycoplasma hyopneumoniae*, utilizando anticorpos monoclonais (Mab) F265, inibidores da aderência de *Mycoplasma hyopneumoniae* aos cílios do epitélio traqueal. Os Mab F265 reconheceram predominantemente uma proteína de 97 kDa (P97) do *Mycoplasma hyopneumoniae* por imunoblotting. Foi ainda observado que as proteínas detectadas por Mab F265 em diferentes cepas variam de tamanho, indicando que o epítipo dos antígenos para Mab F265 sofrem variação intra-espécies. ROSS (1999), estudando essa aderência, observou que duas proteínas na membrana do organismo de 97 e de 145 kDa parecem estar envolvidas neste processo.

KAHANE e RAZIN (1969), ao realizarem análises imunológicas, constataram que os principais fatores antigênicos dos micoplasmas estão localizados na membrana e ao serem aquecidos a 65°C, perderam a sua capacidade antigênica, indicando sua natureza protéica. HWANG et al. (1986), estudando a composição fosfolipídica da membrana do *Mycoplasma hyopneumoniae*, concluíram que esta se constitui de difosfatidilglicerol e que os principais ácidos graxos encontrados são o ácido linoleico e palmítico.

GINSBERG e NICOLET (1973), citados por MESSIER e ROSS (1991), evidenciaram inicialmente que os micoplasmas possuem um fator mitogênico para os linfócitos e confirmando essa informação, MESSIER e ROSS (1991) observaram que esse fator presente na membrana do *Mycoplasma*

hyopneumoniae seria o responsável pelas hiperplasias linfóides perivasculares e peribronquiais, características da pneumonia micoplásmica dos suínos. De acordo com YAMAMOTO (1994), além de se comportar como mitógeno para os linfócitos B e T, também é possível que esse fator induza a proliferação de células T citotóxicas, com a produção de interleucina -2 e interferon (α , β , γ) podendo também suprimir a função das células T, o que explicaria a depressão da resposta imune ou mesmo a infiltração maciça de células linfóides.

THACKER et al. (2000) e THANAWONGNUWECH et al. (2001) observaram que o *Mycoplasma hyopneumoniae* induz a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1 (IL-1), IL- 6 e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). OKADA et al. (2000) observaram como resultado desse aumento que a pneumonia é caracterizada por hiperplasia linfóide nas áreas peribronquiais e perivasculares e também pela infiltração de células inflamatórias nas vias aéreas. Além disso, o aumento nos níveis de TNF- α indica que os macrófagos e os neutrófilos têm um importante papel na sua produção. THANAWONGNUWECH et al. (2001) investigaram em um sistema *in vitro* a indução de citocinas pró-inflamatórias pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e observaram que os níveis de IL-1 β , IL-8 e IL-10 estavam aumentados. A IL-8 elevada pode indicar presença de infecção; entretanto, os níveis de TNF- α não se encontravam aumentados, indicando que a causa da elevação do nível dessas citocinas poderia ser uma resposta inespecífica aos danos teciduais, o que possui relevância em uma pneumonia crônica induzida por esses microorganismos. Esses autores observaram ainda que o aumento de IL-10 pode ser importante para a potencialização de pneumonia induzida pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV).

A infecção micoplásmica pode resultar em uma diminuição da resposta imune do hospedeiro (ADEGBOYE, 1978). TAJIMA et al. (1984) estudaram essa imunodepressão e observaram que os mecanismos mediados por células são importantes para o desenvolvimento das lesões pulmonares. KISHIMA et al. (1985) observaram que a membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* mesmo inviável, ainda mantém o seu efeito imunossupressor. CARUSO e ROSS (1990) descreveram a existência de imunodepressão durante a infecção aguda, embora

outros autores tenham descrito uma estimulação linfocitária em suínos com micoplasmose aguda. De acordo com MAES et al. (1996), essa infecção resulta na depressão da resposta humoral, devido ao fato de os linfócitos terem a capacidade de produção de anticorpos reduzida. LORDEN (2000) concluiu, dessa forma, que esse agente é um co-fator para o comprometimento do sistema imune.

Segundo MIMS et al. (1995), esses patógenos agem como superantígenos, os quais estimulam excessivamente o sistema imune. Os superantígenos são glicoproteínas que têm arranjo espacial e expõem vários epítomos simultaneamente, estimulando em excesso as células imunocompetentes (JOHNSON ET AL., 1992). Os micoplasmas são poderosos ativadores policlonais, promovendo a proliferação de células T e também a produção de citocinas (MIMS et al., 1995). Ocorre uma hiperestimulação seguida de uma imunodepressão, pois as células T ativadas pelos superantígenos podem sofrer apoptose após a ativação. Além disso, somente 0,001 a 0,01% dos linfócitos T ativados é capaz de executar uma resposta regular ao antígeno (JOHNSON et al., 1992; MIMS et al., 1995). Esses microrganismos podem ter efeito depressor nos macrófagos, promovendo ainda redução da capacidade dos linfócitos em produzir anticorpos ou aumentando a atividade supressora das células T (DONE, 1996). Por serem superantígenos, os micoplasmas podem resultar na depressão da resposta imune, pela redução da capacidade de produção de anticorpos e pela inibição da fagocitose realizada por macrófagos (MAES et al., 1996).

Muitos agentes secundários podem estar envolvidos na pneumonia enzoótica suína dentre eles destacam-se: *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Salmonella cholerasuis*. A *P. multocida* é um dos contaminantes mais importantes, sendo considerada incapaz de invadir o sistema respiratório sem que haja um dano prévio (CIPRIAN et al., 1994; STEVENSON, 1998). CIPRIAN et al. (1988), AMASS et al. (1994) e CIPRIAN et al. (1994), ao estudarem a interação entre o *Mycoplasma hyopneumoniae* e a *Pasteurella multocida*, observaram que este último não é um agente patogênico isolado, mas quando está associado ao *Mycoplasma hyopneumoniae*, pode tornar a pneumonia severa, intensificando os sinais clínicos e as lesões pulmonares.

Geralmente, a enfermidade se manifesta quando o hospedeiro é submetido a um estado de estresse ou quando o sítio em que se localiza o micoplasma é invadido posteriormente por outros agentes (YAMAMOTO, 1994).

SMITH et al. (1973) citado por CIPRIAN et al. (1994), ao infectarem suínos gnotobióticos intranasalmente e intratraquealmente com *Mycoplasma hyopneumoniae* e *P. multocida* tipo A, observaram que a infecção com ambos os agentes tornava a pneumonia mais severa, sugerindo um possível efeito aditivo ou sinérgico entre eles. YAGIHASHI et al. (1984) relataram que a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* aumentou a severidade da pneumonia causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Adicionalmente, observaram que os micoplasmas prejudicam a fagocitose dos *Haemophilus* realizada pelos neutrófilos, parecendo ter também um efeito imunodepressor no hospedeiro. CARUSO e ROSS (1990) estudaram os efeitos da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* e por *Actinobacillus pleuropneumoniae* sobre o papel da fagocitose exercida pelos macrófagos alveolares, utilizando ensaios *in vitro*, e concluíram que a função dos macrófagos alveolares de suínos é reduzida quando infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae*, o que faz aumentar a susceptibilidade a agentes secundários. STRASSER et al. (1992), observaram a interação entre *Mycoplasma hyopneumoniae* e *M. flocculare* e verificaram que a inoculação de ambos não influenciou o aspecto clínico e patológico das doenças. Ademais salientaram que a infecção por *M. flocculare*, quando ocorre isoladamente, não desencadeia o aparecimento de lesões, concluindo ser este microrganismo apatogênico. THACKER et al. (1999) observaram que a infecção com *Mycoplasma hyopneumoniae* potencializa e prolonga clinicamente, macroscopicamente e microscopicamente a pneumonia induzida pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), demonstrando dessa forma que existe um efeito de potencialização de uma infecção viral por espécies de micoplasmas. THACKER et al. (2001), ao estudarem a interação entre o *Mycoplasma hyopneumoniae* e o vírus da Influenza Suína observaram que os animais infectados previamente com o *Mycoplasma hyopneumoniae* e 21 dias após com vírus da Influenza Suína, apresentaram sinais de tosse mais frequentes

e também que a pneumonia apresentava-se mais extensa, sem, contudo, haver um aparente aumento da severidade das lesões microscópicas.

O *Mycoplasma hyopneumoniae* escapa das defesas naturais do hospedeiro, fixando-se à sua mucosa (YAMAMOTO, 1994). Além disso, esse agente tem a habilidade de mimetizar várias superfícies antigênicas, podendo ter diversas cepas com diferentes virulências, e utilizar essa variação para evadir do sistema imune (DONE, 1996). Sua localização luminal de aderência o protege contra as defesas do hospedeiro, o que pode explicar a dificuldade de eliminação desse organismo.

A transmissão pode ocorrer pelo contato direto com as secreções respiratórias do suíno portador ou via aerossóis, além disso, poeiras e fômites também podem carrear o agente. Certos tipos de ambiente e condições topográficas podem facilitar a transmissão aérea entre granjas (STEVENSON, 1998), mas uma das rotas mais prováveis para a introdução de pneumonia enzoótica em um rebanho é a introdução de animais infectados no rebanho livre.

3.4- Sinais Clínicos

Para se realizar o diagnóstico correto de Pneumonia enzoótica suína, deve-se verificar o histórico e o aspecto clínico da doença. Nesse caso, os sinais observados com maior frequência são tosse não-produtiva, queda da taxa de crescimento e da eficiência alimentar, alta morbidade, baixa mortalidade e, em casos mais severos, pode-se observar piroxia, letargia, dispnéia, cianose e morte (OBOEGBULEN, 1981; MAES et al., 1996).

As faixas etárias mais acometidas são a recria e a terminação, pois são nessas etapas que se inicia a queda da imunidade colostrar (PIFFER e ROSS, 1984). Segundo MAES et al. (1996), os suínos de todas as idades são susceptíveis à infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Inoculações experimentais de *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos demonstraram que o desenvolvimento de doença clínica e o período de incubação são doses dependentes, pois em altas doses, houve o desenvolvimento de uma pneumonia clínica, em doses moderadas, desenvolveu-se uma pneumonia clínica após um prolongado período de incubação e, em baixas doses, desenvolveu-se

uma infecção subclínica (STEVENSON, 1998). A tosse pode ser observada a partir de quatro semanas do início da infecção e sua duração vai depender da resposta imune do animal e do manejo do rebanho.

3.5- Lesões

As lesões macroscópicas são encontradas na porção ventral dos lobos apicais, cardíacos e intermediários e na porção cranial do lobo diafragmático do pulmão. Os linfonodos bronquiais e mediastínicos podem estar aumentados de volume (MAES et al., 1996). Na fase aguda, as lesões pulmonares manifestam-se como áreas edematosas; já nos estágios crônicos, observam-se atelectasia, áreas de consolidação púrpura à cinza nas regiões antero-ventrais dos pulmões e também a presença de áreas enfisematosas nas adjacências. Essas lesões foram primeiramente observadas por LIVINGSTON et al. (1972) quatorze dias após a infecção e o desenvolvimento da severidade máxima ocorreu entre 21 a 28 dias.

BETTS (1952), citado por OBOEGBULEN, (1981), descreveu as lesões como áreas de coloração acizentada e claramente demarcadas em comparação ao tecido normal, acometendo, em ordem decrescente, os lobos apicais, cardíacos, intermediários e diafragmáticos.

Quando a pneumonia complica-se com agentes secundários, passa a apresentar uma broncopneumonia inicialmente catarral com as áreas afetadas edematosas e de coloração avermelhada. Com o decorrer do processo, o exsudato torna-se purulento e as áreas atingidas exibem uma coloração púrpura escura de aspecto atelectásico. Esse aspecto consolidado contrasta fortemente com as áreas adjacentes normais na fase subaguda, podendo-se ainda verificar a presença de enfisema compensatório (OBOEGBULEN, 1981; INTRAKSA et al. 1983; STRASSER et al., 1992).

As lesões microscópicas inicialmente consistem de pequeno infiltrado neutrofílico no lúmen e ao redor das vias aéreas, assim como nos alvéolos (ROSS, 1999). Pode-se observar também uma infiltração linfo-histocítica em áreas peribronquiolares e perivasculares, revelando um quadro de broncopneumonia com alveolite supurada (THACKER et al., 1999).

URMAN et al. (1958) citado por OBOEGBULEN (1981), descreveram as primeiras alterações histopatológicas da pneumonia enzoótica suína, traduzidas por linfonodos hiperplásicos, células linfocíticas infiltradas na lâmina própria dos brônquios e infiltração perivascular e peribronquial. Muitos autores relataram idênticas lesões (GOOWIN e WHITTLESTONE, 1963; MARE e SWITZER, 1965; LIVINGSTON et al., 1972; OBOEGBULEN, 1973; citados por OBOEGBULEN, 1981). De acordo com LIVINGSTON et al. (1972) as lesões microscópicas apresentam maior severidade ao redor do décimo quarto dia de infecção e ainda permanecem severa até o trigésimo sétimo dia.

As lesões microscópicas são características traduzidas por epitélio respiratório hiperplásico com diminuição ou mesmo ausência de cílios (OBOEGBULEN, 1981). KWON e CHAE (1999) observaram, nos estágios agudos da doença, que, além da perda dos cílios e esfoliação de células ciliadas, são freqüentes acúmulos de neutrófilos no lúmen e ao redor de ductos aéreos e aumento do número de células mononucleares nos espaços peribronquiolares e perivasculares.

3.6- Diagnóstico

O diagnóstico rápido e preciso da pneumonia enzoótica é essencial para prevenir a disseminação de seu agente (LE POTIER et al., 1994), podendo ser realizado pelos sinais clínicos associados à presença de lesões macroscópicas. Como exames complementares é utilizado uma variedade de métodos, sendo mais usuais a imunofluorescência, o cultivo do organismo, a PCR e a sorologia (AHRENS e FRIIS, 1991; ROSS e STEMKE, 1995; DONE, 1996). As dificuldades para a identificação do agente da pneumonia micoplásmica incluem a presença simultânea de várias espécies de micoplasmas no tecido e a dificuldade de se recuperar em cultura pura alguns desses microorganismos (POTGIETER e ROSS, 1972).

3.6.1- Lesões ao Abate

O monitoramento das lesões ao abate constitui-se numa fonte relativamente simples e de baixo custo, contendo informações, às vezes cruciais,

sobre o estado sanitário de um rebanho, possibilitando a avaliação de uma grande variedade de doenças, mediante a realização de estudos de diagnóstico, de prevalência, de incidência e até mesmo de avaliação econômica, além de estratégias de prevenção e controle (ROSTAGNO et al., 1999).

Em casos de pneumonia enzoótica, são encontradas lesões típicas, como áreas de consolidação púrpura a cinza nos lobos apical e cardíaco e nas regiões ântero-ventrais dos lobos diafragmático. Algumas vezes, apenas um lobo pode estar afetado. Existe eventualmente um exsudato mucoso nos bronquíolos, além de ligeiro aumento de volume dos linfonodos traqueal e bronquial (ETHERIDGE et al., 1979).

A pneumonia micoplásmica suína pode ser inicialmente diagnosticada pela evidência *post mortem* de infecção, como a presença típica de lesões macroscópicas e microscópicas. A identificação do *Mycoplasma hyopneumoniae* pode ser realizada pelo teste de imunofluorescência em cortes de pulmão e/ou pelo cultivo desse agente recuperado de tecidos pulmonares (ARMSTRONG et al., 1984). A ausência de lesões macroscópicas típicas é interpretada, pela Agência Nacional de Suínos SPF, como livre de infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (ROSTAGNO et al., 1999). Todavia, para ARMSTRONG et al. (1984), esse julgamento é visto com reservas, pois em seu experimento, observaram que 19% dos pulmões normais apresentavam-se infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae*, concluindo que a ausência de lesões macroscópicas não descarta a possibilidade de o animal apresentar pneumonia micoplásmica e também que as lesões macroscópicas são um bom indicador, mas não absoluto de infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

STRAW et al. (1989) citado por HURNIK et al. (1993), observaram que os decréscimos no ganho de peso são proporcionais à severidade das lesões.

Existem trabalhos que estimam uma correlação de 91% entre o diagnóstico macroscópico e a confirmação histológica, embora a sensibilidade e a especificidade da observação ao abate não tenham sido calculada (HUHN, 1970 citado por HURNIK et al., 1993). De acordo com HURNIK et al. (1993), a pneumonia enzoótica está associada à infecção pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, seguida e complicada por agentes secundários. Esses autores

estudaram a sensibilidade e especificidade da inspeção rápida macroscópica dos pulmões na linha de abate e observaram que esta pode ser realizada, devido ao fato de serem as lesões macroscópicas bem características. E ainda, utilizando-se a histologia de uma amostra padrão, observaram que o exame macroscópico apresentou sensibilidade de 76% e especificidade de 71%. Segundo DONE (1996), as lesões macroscópicas são sugestivas, mas não patognomônicas de pneumonia enzoótica; entretanto, encontrou-se uma boa relação entre a detecção de anticorpos pelo teste de fixação de complemento e as lesões macroscópicas em rebanhos naturalmente infectados.

ROSTAGNO et al. (1999), utilizando o monitoramento das lesões macroscópicas ao abate, concluíram que a frequência dessas é influenciada pela incidência da doença, pela taxa de resolução das lesões e pelo tempo de surgimento da doença durante as fases que compõem o ciclo de produção de suínos.

3.6.2- Cultivo

O isolamento do *Mycoplasma hyopneumoniae* é uma técnica cara que consome muito tempo e que requer meio seletivo e especializado, o que a torna dispendiosa e pouco viável (AHRENS e FRIIS, 1991; HURNIK et al., 1993), fazendo com que não seja executada rotineiramente para diagnóstico laboratorial (MAES et al., 1996).

Segundo MAES et al. (1996), o *Mycoplasma hyopneumoniae* cresce lentamente e necessita de um meio especial. Além disso, seu crescimento geralmente é superado pelo *Mycoplasma hyohinis*, um agente muito comum no trato respiratório suíno, sendo um invasor secundário comum da pneumonia enzoótica. O *Mycoplasma flocculare* também é encontrado com frequência no tecido pulmonar e, diante das muitas similaridades antigênicas, morfológicas e de crescimento entre eles, dificulta ainda mais a identificação do agente da pneumonia enzoótica.

De acordo com ROSS (1999), o *Mycoplasma hyopneumoniae* é um microorganismo fastidioso, mais difícil de se isolar e identificar, além de requerer 30 dias para o crescimento visível (STEVENSON, 1998).

3.6.3- Técnicas de Sorodiagnóstico

Desde o estabelecimento do *Mycoplasma hyopneumoniae* como agente etiológico da pneumonia enzoótica suína por MARE e SWITZER (1965), citados por OBOEGBULEN (1981), numerosos estudos têm sido realizados para aumentar a eficiência de diagnósticos sorológicos (MCKEAN et al., 1979).

Os testes sorológicos têm limitações em sua sensibilidade e especificidade na rotina de diagnóstico, e os utilizados para a detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* incluem: Hemaglutinação Indireta (IHA), teste de Fixação de Complemento (FC) e o “Enzyme-Linked Immunosorbent assay” (ELISA) (ROSS e WHITTLESTONE, 1983, citados por ROSS e STEMKE, 1995), sendo esse último o mais sensível, principalmente se o antígeno estiver purificado (KOBISCH e NICOLET, 1987). Todos esses testes podem ser utilizados para infecções subclínicas do rebanho ou para a demonstração da resposta à vacina, mas não são recomendados para animais individuais (ARMSTRONG, 1994). Segundo GIMENO (1995), os inconvenientes da sorologia estimulam a busca de métodos compatíveis com o processo histológico de rotina.

Para se estabelecer a dinâmica da infecção dentro de um rebanho, o mais apropriado é se utilizar a sorologia ao invés dos sinais clínicos (MAES et al., 1996), com os resultados obtidos em cada método sendo interpretados com base no estado sanitário do rebanho.

3.6.3.1- Hemaglutinação Indireta (IHA)

O teste de IHA é útil para a detecção de rebanhos infectados por micoplasmas (SHULLER et al., 1977 citado por TIMONEY et al., 1992) e é considerado um teste sorológico sensível para a detecção de anticorpos contra esses agentes, principalmente para o *Mycoplasma hyopneumoniae* (GOODWIN et al., 1969, citados por HOLMGREM, 1976).

Os materiais necessários para a realização deste teste são eritrócitos frescos, uma vez que, após longos períodos de armazenamento, as hemácias tornam-se instáveis, o que é uma desvantagem do método. Segundo HOLMGREM (1976), quando esses eritrócitos são formalizados, obtêm-se

melhores resultados, devido ao maior número de células que podem ser sensibilizadas e armazenadas na forma de pequenas alíquotas.

Para FREEMAN et al. (1984), este teste é confiável para a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* de suínos infectados experimentalmente com altas doses do agente, mas não tão efetivo para detectar anticorpos de suínos infectados naturalmente.

De acordo com KAZAMA et al. (1989), o teste de IHA tem pouca sensibilidade para detectar reação cruzada. Em estudos prévios, FREEMAN et al. (1984) observaram que, os testes positivos, além de títulos de anticorpos para *Mycoplasma hyopneumoniae*, também apresentaram títulos para *M. flocculare*.

3.6.3.2- Teste de Fixação de Complemento (FC)

É um teste adequado para o diagnóstico de pneumonia enzoótica suína presente no rebanho, podendo também ser utilizado para o diagnóstico diferencial. Além disso, pode ser utilizado para monitorar a pneumonia enzoótica de um rebanho (WALLIS e THOMPSON, 1969).

Segundo FREEMAN et al. (1984), o título de anticorpos detectado por esse teste é menor do que pelo ELISA, concluindo-se que se trata de um teste de menor sensibilidade.

De acordo com KAZAMA et al. (1989), a sensibilidade do teste de fixação de complemento só é adequada nas fases iniciais e médias de infecção, pois, em estágios tardios este se torna negativo, o que pode resultar em um resultado falso-negativo (ARMSTRONG, 1994).

LOYDE (1984), citado por TIMONEY et al. (1992), detectou anticorpos anti *Mycoplasma hyopneumoniae* cinco semanas após a infecção. Segundo DONE (1996), essa técnica detecta anticorpos duas a três semanas após a infecção e pode persistir ainda por nove meses.

Uma desvantagem desse teste para a detecção de anticorpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, é que além de não detectar anticorpos nos estágios tardios de infecção, há a probabilidade de ocorrer reação cruzada com *M. flocculare* e *M. hyohinis* (STEVENSON, 1998).

3.6.3.3- Teste de ELISA

O teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) foi relatado recentemente como um método de diagnóstico sorológico para pneumonia micoplasmica suína. Sua aplicação para o estudo de diversas doenças infecciosas tem sido realizada por ser simples, específico e seguro (MORRIS et al., 1995; KAZAMA et al., 1989; ROSS e STEMKE, 1995), além de ser capaz de detectar anticorpos por um período de tempo mais longo do que pelos testes de FC e IHA (ARMSTRONG, 1994). O ELISA é extremamente sensível, mas não totalmente específico, devido à ocorrência de reações cruzadas entre o *Mycoplasma hyopneumoniae* e o *M. flocculare*, sendo esse último de distribuição mundial, mas de patogenicidade incerta (ARMSTRONG et al. 1984; KAZAMA et al., 1989; ARMSTRONG, 1994).

Os problemas relacionados com a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos (MACKEAN et al., 1979) levaram ao desenvolvimento de novos sistemas de testes de ELISA (NICOLET e PAROZ, 1980).

Em seu estudo, NICOLET e PAROZ (1980) obtiveram antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* após o tratamento com Tween 20 neutro e observaram que o antígeno purificado com esse detergente mostra qualidades promissoras para as propostas sorológicas. O tipo de ELISA Tween 20, para o qual são utilizados anticorpos monoclonais, é altamente específico, não ocorrendo reações cruzadas (DONE, 1996). O teste "DAKO" é um teste de ELISA bloqueado, baseado em anticorpos monoclonais contra a proteína de 74 kDa do *Mycoplasma hyopneumoniae*. Neste não há ocorrência de reação cruzada, além de ser mais sensível do que o de IHA, o qual foi desenvolvido para ser um teste sorológico mais específico (LE PONTIER et al., 1994).

LEVONEN (1994) observou que os anticorpos aparecem no colostro quatro dias a seis meses antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença e estimou a especificidade do ELISA neste estudo como alta, com 99,4%, concluindo, dessa forma, que o colostro é uma amostra adequada para a realização do teste de ELISA.

Segundo MOLINA et al. (1998), os anticorpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* podem ser detectados pelo teste de ELISA de três semanas até

um ano após a infecção. Além disso, ARMSTRONG et al. (1983) citados por KAZAMA et al. (1989), relataram que o ELISA é capaz de detectar anticorpos por um período de tempo maior do que os testes FC e IHA após a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*. STEVENSON (1999), citado por MORENO et al. (1999), descreveu a alta sensibilidade do ELISA empregado em seu experimento com utilização de anticorpos monoclonais específicos para um epítipo protéico encontrado nas amostras de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, que não está presente em outras espécies de micoplasmas, tornando possível a detecção de animais positivos nove dias após a infecção. Além disso, a maioria das vacinas utilizadas não induz a produção de anticorpos para esse epítipo, o que torna esse teste viável para ser utilizado em um rebanho vacinado.

3.6.3.4- Reações Cruzadas

Os métodos sorológicos são mascarados por reações cruzadas, devido à íntima associação entre *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma flocculare* (AHRENS e FRIIS, 1991).

Recentes isolamentos de *M. flocculare* de muitos rebanhos suínos nos Estados Unidos enfatizam a importância desse agente como origem de uma grande confusão na interpretação das respostas sorológicas (FREEMAN et al., 1984).

A infecção por *M. flocculare* pode estar espalhada, indicando que anticorpos para este agente possam estar comumente no soro de suíno, causando assim uma reação não específica nos testes de sorodiagnóstico para pneumonia micoplásmica suína. Estudos sugeriram que o suíno infectado com *M. flocculare* usualmente não desenvolve níveis de anticorpos suficientes para prejudicar a especificidade do ELISA usado para pneumonia enzoótica suína (ARMSTRONG et al., 1987).

3.6.4- Técnicas Moleculares

Os procedimentos de biologia molecular visam detectar as seqüências particulares de ácidos nucleicos, que podem representar um microorganismo

patogênico, estrutura ou expressão de genes específicos (BRASILEIRO FILHO et al., 1998).

3.6.4.1- Hibridização *In Situ*

Os ácidos nucléicos, assim como outras macromoléculas, ocupam posições precisas em células e tecidos e uma grande quantidade de potencial informação é perdida quando essas moléculas são extraídas por homogeneização. Por esta razão, foram desenvolvidas técnicas nas quais as sondas de ácidos nucléicos são utilizadas, como se fossem anticorpos marcados, para localizar seqüências específicas de ácidos nucléicos "in situ", num procedimento chamado hibridização "in situ" (BRASILEIRO FILHO et al., 1998).

Este é um método de hibridização molecular em que a seqüência alvo está em seu local nativo, ou seja, em células ou tecidos, podendo-se utilizar dessa forma cortes histológicos ou esfregaços celulares.

A principal vantagem desta técnica é a localização precisa do antígeno de interesse dentro de células ou tecidos. Além disso, como permite a análise de células individuais, é capaz de identificar microorganismos, mesmo quando a menor parte das células está infectada.

A hibridização *in situ* pode identificar os tipos de células hospedeiras que sofreram a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* com maior especificidade e sensibilidade (KWON e CHAE, 1999).

Esta prova é considerada específica para *Mycoplasma hyopneumoniae*, pois é possível detectá-lo em amostras de tecidos pulmonares de suínos experimentalmente infectados (MAES et al., 1996) e foi relatada por muitos autores para detectar e caracterizar micoplasmas (ROSS e STEMKE, 1995).

Embora essa prova seja útil para a identificação de cultura de micoplasmas, a detecção direta em espécimes clínicos de suínos infectados não foi demonstrada, devido às limitações de sensibilidade. Entretanto, AHRENS e FRIIS (1991) detectaram *Mycoplasma hyopneumoniae* em espécimes clínicos de animais infectados de forma aguda, utilizando esta prova.

Uma elevada variação antigênica foi relatada para o genoma de micoplasmas, podendo-se esperar, assim, que as sondas de DNA de certas partes

do genoma possam variar, o que reduziria seu uso clínico para o diagnóstico da micoplasmose (AHRENS e FRIIS, 1991).

3.6.4.2- Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

O *Mycoplasma hyopneumoniae* também pode ser demonstrado por PCR, o qual é baseado na multiplicação do DNA (MAES et al., 1996). Trata-se de um método fácil, rápido, versátil e sensível para estudos moleculares que envolvem um grande número de indivíduos (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998), além de ser específico para a detecção de microorganismos fastidiosos (BAUMEISTER et al., 1998). Segundo CHRISTENSEN et al. (1999), é uma técnica nova para a detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* nos pulmões, lavados traqueobrônquicos e swabs nasais.

De acordo com ROSS e STEMKE (1995), este método pode identificar uma pequena quantidade de microorganismo nos estágios iniciais de infecção, além de poder detectá-lo em amostras de pulmão de animais clinicamente saudáveis e aparentemente carreadores.

Diferentes procedimentos de PCR foram descritos, mas nenhum desses foram avaliados sob condições naturais. BAUMEISTER et al. (1998), em sua investigação, desenvolveram um procedimento de PCR com a utilização de amostras para a detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em lavados de fluídos broncoalveolares (LFBA) e seus resultados foram comparados com testes de imunofluorescência e cultura.

A correlação entre os resultados obtidos pelo PCR utilizando LFBA e IF com secções pulmonares indicou sensibilidade similar de ambos os métodos e ainda, concluíram que com este método, uma informação rápida e segura sobre a ocorrência de *Mycoplasma hyopneumoniae* no rebanho pode ser obtida.

As vantagens da técnica de PCR são muitas. Dentre elas destacam-se: a não ocorrência de reação cruzada, a não interferência com tratamento à base de antibiótico (MAES et al., 1996), a possibilidade de utilização de animais vivos, a economia de tempo comparada às culturas tradicionais e a possibilidade de aplicação em grande escala (CHRITENSEN et al., 1999).

As desvantagens da utilização da técnica de PCR incluem o fato de não informar a localização específica do *Mycoplasma hyopneumoniae* nos tecidos afetados (KNOW e CHAE, 1999) e seu elevado custo, o que, às vezes, inviabiliza a sua utilização em rotinas laboratoriais.

3.6.5- Imunohistoquímica

Os métodos de imunohistoquímica se baseiam na conjugação de distintos marcadores com moléculas de imunoglobulinas. Constitui-se num método complementar a histopatologia, no qual a marcação de anticorpos com diversas enzimas ou compostos fluorescentes permite localizar determinantes antigênicos nas intimidades das células e tecidos fixados e processados por métodos histológicos convencionais (GIMENO, 1995). Foi demonstrado por POLAK et al. (1978) que esses métodos são mais sensíveis que os de Imunofluorescência.

As técnicas imunohistoquímicas mais utilizadas atualmente se baseiam na marcação com a enzima peroxidase. Em todos os métodos imuno-enzimáticos utiliza-se uma reação enzima-substrato que transforma um cromógeno incolor em um produto final colorido (GIMENO, 1995).

3.6.5.1- Imunofluorescência

A Imunofluorescência é um tipo de técnica imunohistoquímica operacionalmente simples, barata e prática para o diagnóstico de pneumonia micoplásmica (ARMSTRONG, 1994) e tem sido utilizada com sucesso para a detecção direta do *Mycoplasma hyopneumoniae* no pulmão de suínos. Consiste em revelar antígenos presentes em uma estrutura celular ou tissular, de forma direta ou indireta, mediante a aplicação de um anti-soro fluorescente ou fluorocromo nas células ou tecidos. A leitura é realizada em microscópio de luz ultravioleta, o qual tem um alto custo (MORALES, 1993). Além disso, necessita de material fresco (GIMENO, 1995). Por essa razão, é limitada a sua utilização e sua aceitação, em geral pelos laboratórios de patologia (HUAN, 1976; MOLINA et al., 1983; NASSON, 1988 citados por GIMENO, 1995). As outras desvantagens da Imunofluorescência incluem a necessidade de fotografia para servir como testemunho, pois a coloração desaparece logo após a sua observação,

devido a excitação ultravioleta. MAES et al. (1996) observaram ainda que é possível a ocorrência de reações cruzadas.

Devido a essas limitações, buscaram-se métodos mais compatíveis com as práticas de rotina, como por exemplo, os imuno-enzimáticos que demonstraram maior sensibilidade na identificação de antígenos, além de permitir uma reação permanente em tecidos fixados e embebidos em parafina (MERINO e MARTÍNEZ, 1988).

3.6.5.2- Imunoperoxidase

A imunoperoxidase é um tipo de técnica imunohistoquímica que utiliza como marcador a enzima peroxidase, apresentando várias vantagens sobre a de imunofluorescência. Pode ser utilizada conjuntamente com os métodos de rotina no laboratório de histopatologia com o uso de preparados permanentes que podem ser armazenados indefinidamente (LUTSKY et al., 1986), possibilitando, assim, a realização de estudos retrospectivos (MORALES, 1993; ROSS e STEMKE, 1995).

Dentre as principais técnicas associadas à enzima peroxidase estão: imunoperoxidase direta, imunoperoxidase indireta, peroxidase anti-peroxidase e a que utiliza o complexo-avidina-biotina (ABC).

O método direto é um simples caminho para localizar antígenos pelo uso de uma imunoglobulina específica para o antígeno de interesse, quimicamente conjugada com a peroxidase (NAKANE e PIERCE, 1966, AVRAMEAS et al., 1969; citados por GIMENO, 1995). Sua principal limitação é a de se utilizar para cada antígeno, um anticorpo específico conjugado (GIMENO, 1995).

O método indireto utiliza, para detectar sua presença, um anticorpo secundário marcado com peroxidase (GIMENO, 1995), sendo, por isso, um método mais versátil. Além disso, sua sensibilidade é quatro a cinco vezes maior do que a do método direto (MORALES, 1993).

O método Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) é um dos métodos mais utilizados como rotina e foi a partir dele que se implantou firmemente a técnica da imunohistoquímica nos laboratórios de patologia (GIMENO, 1995). Este se baseia na utilização de três reagentes: anticorpo primário, anticorpo secundário e

o complexo PAP. É comumente utilizado, não só por ter uma alta sensibilidade, mas também devido ao fato de seus reagentes estarem disponíveis comercialmente (HSU et al. 1981). Além disso, essa técnica é de 100 a 1000 vezes mais sensível que os métodos de imunofluorescência.

Os métodos do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) se baseiam na união entre a avidina e a biotina conjugada com a peroxidase. Esse processo leva à formação de um enorme complexo, o qual inclui numerosas moléculas de peroxidase, resultando em notável aumento da sensibilidade, estimando-se 20 a 40 vezes maior do que a da técnica PAP. Entretanto, o grande tamanho desse complexo pode ocasionar uma precipitação inespecífica e pobre penetração nos tecidos (GIMENO, 1995).

3.7- Impacto Econômico

A pneumonia enzoótica é uma doença que se espalha rapidamente sob condições ambientais e seu efeito pode ser retardado pelo padrão de nutrição e pelo emprego de antibióticos (GOODWIN, 1971). Além disso, os efeitos da pneumonia na performance do animal vão depender do manejo e das condições ambientais, pois, em rebanhos saudáveis com condições ambientais limpas, esses efeitos não são facilmente demonstrados.

Essa enfermidade é a responsável pela perda de mais de 200 milhões de dólares por ano na indústria suinícola, custando em média cinco dólares por suíno por produção (LINQUIST, 1974 e WILSON et al., 1986; citados por CHRISTENSEN et al., 1999) e sendo considerada uma das principais causas de perda econômica na produção de suínos, além de estar vastamente distribuída e ocorrer praticamente em todos os países. A presença universal do *Mycoplasma hyopneumoniae* proporciona um significativo impacto econômico na produção de suínos, pois essa enfermidade se torna presente nas faixas de idade mais críticas, que são as fases de crescimento e de terminação, em que o animal ganha peso diariamente. Dessa forma, os surtos de pneumonia enzoótica podem diminuir a eficiência alimentar e a taxa de crescimento do animal. Além disso, esse efeito é ainda maior quando os suínos são confinados em construções mal ventiladas e sob condições de manejo inadequadas (FRASER et al., 1997). Esse impacto pode

estar associado também ao tamanho do rebanho e à densidade, a qual pode levar a altas concentrações de contaminantes aéreos (STEVENSON, 1998), tendo em vista que a pneumonia é resultante da exposição dos animais a uma grande quantidade de microorganismos e às condições estressantes de manejo e ambientais, as quais predispõe os suínos a enfermidades respiratórias (MOLINA et al., 1998).

POINTON (1985) observou, em seu experimento, que, durante o início da infecção, a taxa de crescimento dos suínos reduziu-se 12,7 %. De acordo com STRAW et al. (1989), citados por CHRISTENSEN et al., (1999), a pneumonia enzoótica causa em média uma redução de 17% no ganho de peso diário e 14% na eficiência alimentar. MOLINA et al. (1998) observaram que as lesões de pneumonia enzoótica reduzem o ganho de peso diário de forma proporcional à severidade, com uma estimativa de perda de 23 a 37g /dia por 10% da área afetada pela pneumonia. Estudos prévios, entretanto, não detectaram significativa associação entre a percentagem de lesão pulmonar e os parâmetros de produção e ainda verificaram que as perdas estão mais associadas à história clínica da pneumonia do que às lesões encontradas ao abate (MORRIS et al., 1995 e DAVIES et al., 1995).

Foi estimado que a pneumonia enzoótica aumenta de 6 a 25 dias o tempo normal para a venda, dependendo da severidade da doença, levando dessa maneira a um aumento de US\$ 0,60 a US\$ 2,50 no custo para se levar o animal ao abate com 108 Kg, tendo em vista que o custo diário para a manutenção do animal é de US\$ 0,10 (KIRK, 1996).

Os prejuízos relacionados a essa enfermidade ocorrem principalmente pelo aumento da quantidade de alimento consumido, pela diminuição do ganho de peso diário, pela diminuição da eficiência alimentar, pela variação no crescimento e ainda pelo fato de ser produzido um efeito debilitante no animal (GOODWIN, 1985). Além disso, existem os gastos com tratamento, com programas de vacinação, com procedimentos de higiene e com a mão-de-obra extra (SCHARPERS, 1990; citado por CHRISTENSEN et al., 1999).

Essa doença é freqüente em todo o país. MORENO et al. (1999), analisando soro de suínos de diversos Estados da Federação, observaram que a

freqüência era de 22,6% em São Paulo, 25,35% em Minas Gerais, 47% no Rio de Janeiro, 31,7% em Goiás, 16,6% no Ceará e 50% no Distrito Federal. Esses autores, em um estudo geral, observaram que a freqüência de plantéis positivos no Brasil foi de 59,09%, concluindo-se que esse agente se encontra disseminado no país.

SOBESTIANSKY et al. (1987) e PIFFER e BRITO (1993) demonstraram que a pneumonia está disseminada nos rebanhos de Santa Catarina, pois, segundo um estudo realizado pela Embrapa em aves e suínos de Concórdia - SC, constatou que 55% dos animais eram positivos para pneumonia enzoótica.

3.8- Tratamento e Controle

O tratamento baseia-se na antibioticoterapia, a fim de se controlar as infecções secundárias. Para diminuir a multiplicação do *Mycoplasma hyopneumoniae*, utilizam-se os macrolídeos, compostos por tylosina, tyamulina, lincomicina e outros, os quais impedem a síntese protéica do agente, agindo, dessa forma, como bacteriostático. Os antibióticos podem contribuir para a diminuição dos sintomas e lesões, mas *in vivo* nenhum deles se comporta como "micoplasmicida" (YAMAMOTO, 1994).

A doença pode ser controlada em parte por medicação com tetraciclina, mas esta não previne o estabelecimento da infecção, e as lesões aparentemente se desenvolvem após cessar a medicação (ROSS, 1999).

GOODWIN (1971) relatou a estratégia *all-in/all-out* como uma das técnicas mais importantes para se melhorar o controle de pneumonia enzoótica presente em uma granja.

O controle prático da doença em regiões endêmicas pode ser realizado por meio de uma melhoria no padrão de manejo, incluindo boa nutrição, controle da temperatura, ventilação adequada, diminuição do stress e introdução de animais no rebanho com as devidas medidas profiláticas. A vacinação embora preconizada, não protege o animal de forma efetiva, mas diminui os efeitos causados pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* (MAES et al., 1996).

4- MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 80 fragmentos de pulmões de suínos, predominantemente do tipo carne, com aproximadamente cinco meses de idade, pesando cerca de 100 kg e oriundos de criações intensivas da zona da Mata Mineira, abatidos no Frigorífico Saudali, localizado no município de Ponte Nova-MG.

De acordo com o estado sanitário das granjas, definiu-se previamente por obter 40 fragmentos de pulmões provenientes de granjas positivas para pneumonia enzoótica suína, isto é, aquelas que seus rebanhos apresentassem manifestações clínicas e morfológicas da doença. Similarmente, optou-se por colher 40 fragmentos de pulmões de granjas consideradas livres de *Mycoplasma hyopneumoniae*, ou seja, aquelas sem histórico clínico da doença desde a sua implantação.

Baseado no aspecto macroscópico, os pulmões foram divididos dentro dos seguintes escores:

- 1- Sem lesão aparente
- 2- Processos congestivo-hemorrágicos nas regiões ântero-ventrais do pulmão
- 3-Lesões típicas de pneumonia enzoótica

Após o abate, os pulmões foram identificados meticulosamente examinados, sendo os aspectos morfológicos anotados em protocolo próprio,

ocasião em que também se fazia o registro fotográfico das alterações de maior interesse.

A seguir, as amostras de tecido pulmonar foram acondicionadas em frascos de vidro contendo formol neutro tamponado a 10% e transportados para o Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Nessa ocasião, os referidos fragmentos, medindo aproximadamente 2 cm de comprimento por 1 cm de largura e 0,5 cm de espessura, foram processados segundo técnicas rotineiras em histopatologia, desidratados em concentrações crescentes de álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, cortados a 5 µm e corados pela H-E (PROPHET et al., 1992).

Após realização do exame microscópico os fragmentos de pulmão foram assim agrupados:

- 1- Normal
- 2- Infiltração linfocítica peribronquiolar com início de hiperplasia linfóide
- 3- Exsudação celular e hiperplasia linfóide exuberante

Outros cortes semiconsecutivos foram obtidos para a imunocoloração pela técnica da Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP), que foi realizada no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Bioagro/UFV, utilizando para tal os seguintes procedimentos:

- aquecimento dos cortes histológicos a 56°C por 24 horas e completa desparafinação em dois xilóis com passagens de 30 e 40 minutos cada;
- hidratação em soluções alcoólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% ,70% e PBS pH 7,4 a cada 5 minutos);
- bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio metanólico 3% durante 45 minutos a temperatura ambiente;
- lavagem em PBS pH 7,4;
- digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1mg/ml em PBS pH 7,4 durante 10 minutos a 37°C;
- lavagem por duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4;

- tratamento dos cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS 7,4 e incubação em câmara úmida durante 45 minutos à temperatura ambiente;
- retirada do excesso de soro normal e tratamento das lâminas com anticorpo primário específico (IgG de coelho anti- *Mycoplasma hyopneumoniae*), produzido pela Embrapa-CNSA-Concórdia-SC, diluído 1:100 em PBS pH 7,4;
- incubação durante 18 horas em câmara úmida a 4°C;
- lavagem por três vezes em PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada;
- adição do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), produzido pelo LBCH¹, diluído 1:10 em PBS 7,4;
- incubação em câmara úmida durante 45 minutos a 37°C e posterior lavagem por três vezes, 5 minutos cada, em PBS pH 7,4;
- tratamento com o complexo Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) produzido em coelho (SIGMA®), diluído 1:200 em PBS 7,4 e imediata incubação em câmara úmida durante 45 minutos a 37°C;
- lavagem dos cortes duas vezes em PBS 7,4 durante 5 minutos cada;
- revelação em solução recém preparada [25mg de diaminobenzidina (DAB), 200 µl de H₂O₂ 30 volumes em 100 ml de PBS pH 7,4] durante 3 minutos;
- lavagem das lâminas durante 5 minutos em PBS pH 7,4;
- contra-coloração com Hematoxilina de Harris 1:10 em PBS pH 7,4 por 20 segundos;
- desidratação em álcoois e montagem.

De acordo com a intensidade da imunocoloração, os fragmentos de pulmão foram assim distribuídos:

- 1- Imunomarcção ausente
- 2- Discreta imunorreacção no epitélio respiratório
- 3- Evidente imunomarcção no epitélio bronquial e bronquiolar e no interior de macrófagos

¹ LBCH- Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários

A sensibilidade e a especificidade do método imunohistoquímico foram calculadas a partir da distribuição das frequências apresentadas na TAB. I (FLETCHER,1986; AYRES et al.,1998) tomando como "padrão" o histórico, os sinais clínicos, os aspectos morfológicos dos pulmões e a confirmação sorológica.

TABELA I - Distribuição das frequências de diagnósticos imunohistoquímicos em granjas consideradas positivas e negativas para pneumonia enzoótica suína

	Granjas	Positivas	Negativas	Total
PAP				
Positivo		a	b	a + b
Negativo		c	d	c + d
Total		a + c	b + d	a + b + c + d

- Sensibilidade (S) = $a / a + c \times 100$;

- Especificidade (E) = $d / b + d \times 100$;

a - (verdadeiro positivo) é o número de animais positivos corretamente identificados como positivos pelo teste, conforme o padrão de referência;

b - (falso positivo) é o número de animais negativos incorretamente identificados como positivos pelo teste, conforme o padrão de referência;

c - (falso negativo) é o número de animais positivos incorretamente identificados como negativos pelo teste, conforme o padrão de referência; e

d - (verdadeiro negativo) é o número de animais negativos corretamente identificados como negativos pelo teste, conforme o padrão de referência.

Realizaram-se a análise estatística descritiva e o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre as variáveis macroscopia, microscopia e a imunocoloração pelo PAP. Aceitou-se a correlação como significativa apenas se os valores de p fossem inferiores ou iguais a 0,05 (5%).

5- RESULTADOS

Dos 40 pulmões provenientes de granjas consideradas livres de *Mycoplasma hyopneumoniae*, 34 (85%) não apresentaram lesão aparente ao exame macroscópico, conforme ilustrado na FIG.1, enquanto seis (15%) exibiram apenas discretas alterações circulatórias, caracterizadas por discreta hiperemia focal.

Já nos 40 fragmentos de pulmões colhidos de granjas positivas para *Mycoplasma hyopneumoniae*, 16 (40%) não revelaram lesões aparentes ao exame macroscópico, enquanto outros cinco (12,5%) exibiram alterações circulatórias caracterizadas pela presença de áreas avermelhadas nas regiões ântero-ventrais dos pulmões. Nos 19 (47,5%) pulmões restantes, observaram-se lesões características de pneumonia enzoótica suína, traduzidas por áreas hipocreptantes, hepatizadas, de coloração que variava do púrpura ao cinza, localizadas eletivamente nas porções ventrais dos lobos apicais (FIG.2). Tais áreas eram bem definidas com clara delimitação com o parênquima pulmonar circunjacente que, por vezes, exibia-se ligeiramente enfisematoso. À abertura das vias aéreas verificou-se a presença de exsudato catarral a francamente purulento no interior dos brônquios.

O exame histológico dos pulmões provenientes das granjas consideradas negativas revelou que 39 (97,5%) fragmentos apresentaram-se dentro do limite de normalidade e que apenas um (2,5%) exibiu discreta hiperplasia linfóide no tecido pulmonar.

Já o exame histológico das amostras provenientes de granjas positivas revelou presença de lesões inflamatórias em todos os pulmões examinados. Em 20 (50%) fragmentos verificou-se aumento do número de linfócitos nas áreas perivasculares, peribronquiais e peribronquiolares, com formação de pequenos nódulos linfóides. Nos outros 20 (50%) fragmentos restantes, observaram-se evidente hiperplasia linfóide nas áreas adjacentes aos ductos aéreos associada à exsudação celular relativamente intensa, com predomínio ora de neutrófilos, ora de linfócitos, indicando uma resposta inflamatória mais intensa (FIG.3).

A imunohistoquímica (PAP) realizada nos fragmentos de pulmões de animais provenientes de granjas negativas revelou em nove (22,5 %) amostras, discreta imunorreação, enquanto nas 31 (77,5 %) restantes, não se evidenciou reação imunohistoquímica (FIG.4).

O exame imunohistoquímico (PAP) dos 40 pulmões oriundos de granjas positivas revelou a seguinte distribuição dois (5%) fragmentos não apresentaram imunomarcção, enquanto outros 17 (42,5%) demonstraram reação tênue caracterizada pela presença de delgada camada de aspecto bronzeado na superfície epitelial de brônquios e bronquíolos. As 21 amostras restantes (52,5 %) apresentaram evidente imunomarcção, traduzida por espesso precipitado de coloração amarronzada na superfície do epitélio de revestimento ou na luz das vias aéreas, sobretudo nos brônquios e bronquíolos, podendo ainda serem visualizadas no interior de macrófagos (FIG.5). O número e o percentual de suínos distribuídos com base nos aspectos macro e microscópicos e imunohistoquímicos encontram-se dispostos na TAB.II.

TABELA II – Sinopse e frequência relativa dos diagnósticos morfológicos em pulmões de suínos oriundos de granjas positivas e negativas para pneumonia enzoótica.

Métodos/ granjas	Granjas positivas			Granjas negativas		
	Escores			Escores		
	1	2	3	1	2	3
Macroscopia	16 (40,0%)	05 (12,5%)	19 (47,5%)	34 (85,0%)	06 (15,0%)	0 (0,0%)
Microscopia	0 (0,0%)	20 (50,0%)	20 (50,0%)	39 (97,5%)	01 (02,5%)	0 (0,0%)
Imunohistoquímica	02 (05,0%)	17 (42,5%)	21 (52,5%)	31 (77,5%)	09 (22,5%)	0 (0,0%)

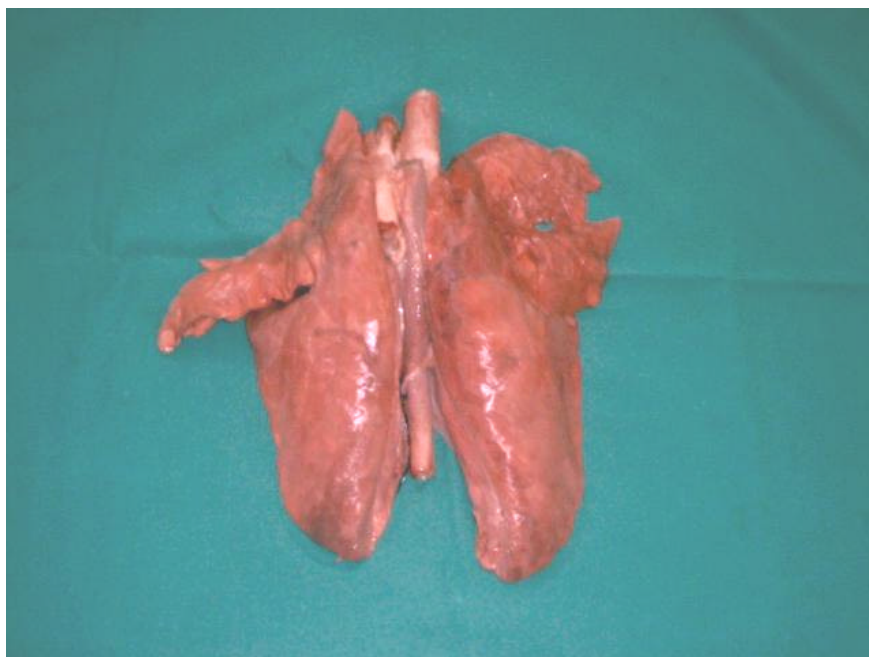


Figura 1. Pulmão de suíno sem lesões macroscópicas de Pneumonia Enzoótica.



Figura 2. Pulmão de suíno com lesões macroscópicas típicas de Pneumonia Enzoótica nos lobos craniais.

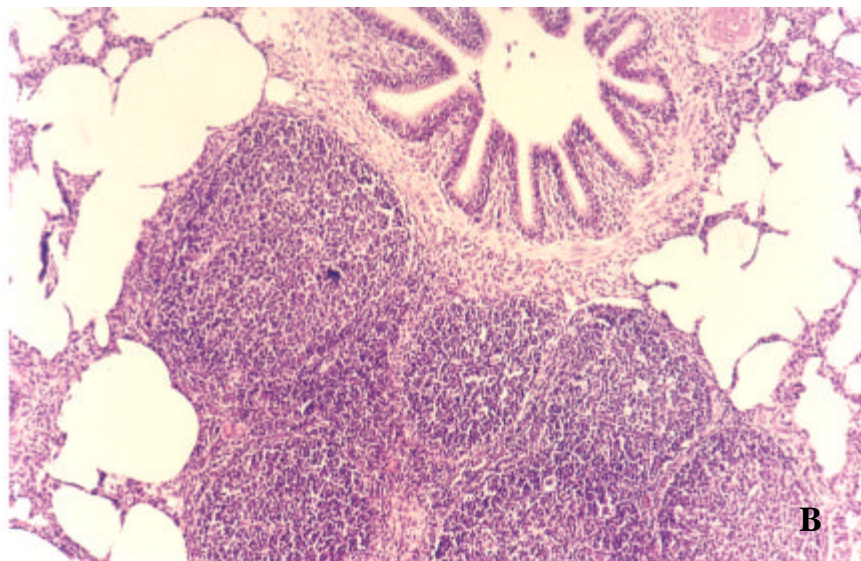
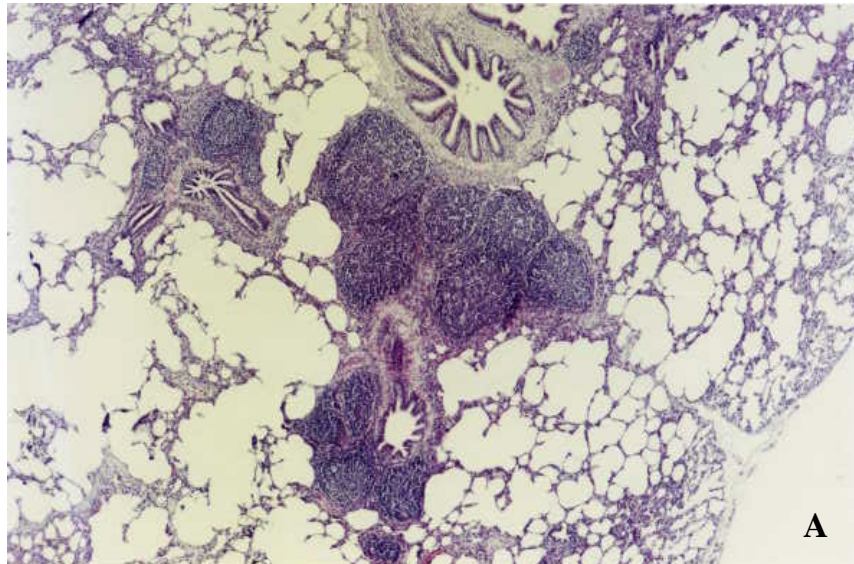


Figura 3. Alterações histopatológicas em pulmão de suíno com Pneumonia Enzoótica, mostrando hiperplasia linfóide peribronquial. **A.** 40x H&E. **B.** 400x H&E.

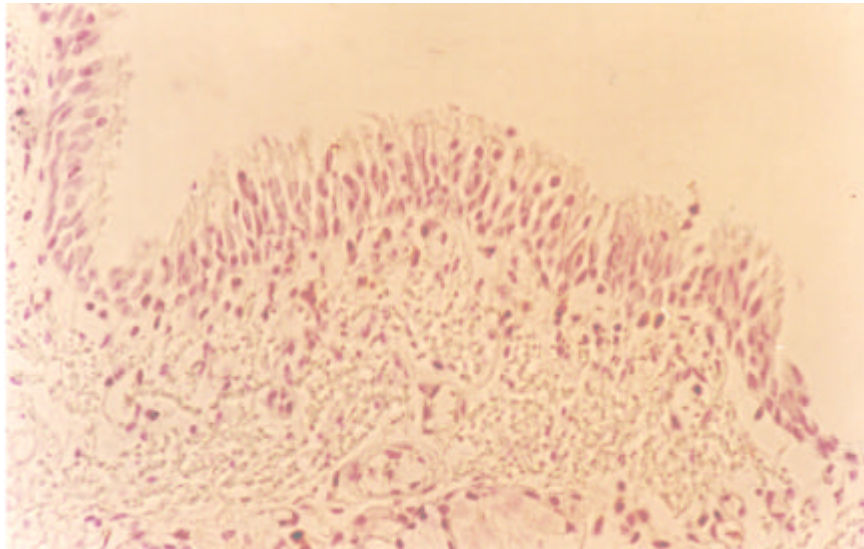


Figura 4. Pulmão de suíno. Epitélio bronquial com ausência de imunomarcacão. 400x. PAP.

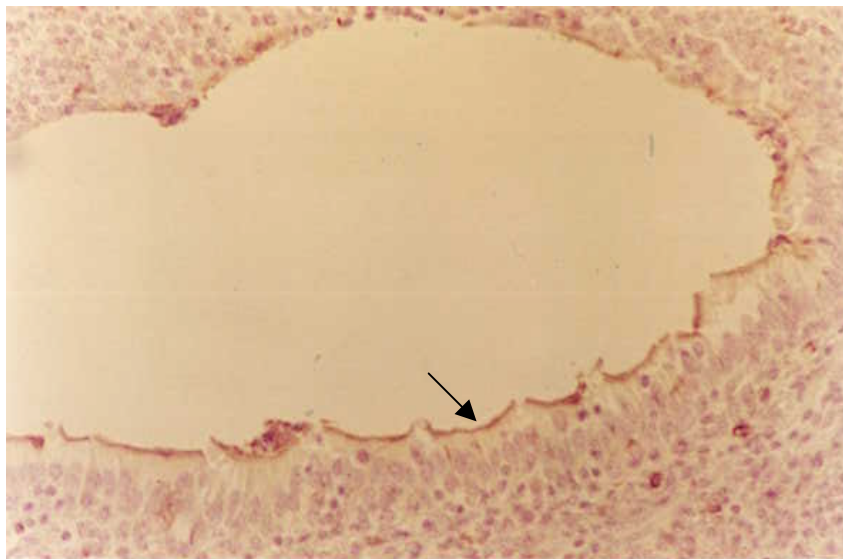


Figura 5. Pulmão de suíno. Brônquio exibindo imunomarcacão na superfície do epitélio de revestimento. 400 x. PAP.

A intensidade das reações observadas pelas técnicas histológicas e imunohistoquímicas apresentou correlação positiva em 77 % dos casos (Tab. III), indicando que a presença de lesão está associada à presença de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Também a confrontação entre os diagnósticos macroscópicos e microscópicos demonstrou forte correlação positiva, ao redor de 70%, condizentes com o valor preditivo das alterações macroscópicas para fins de diagnóstico de pneumonia enzoótica dos suínos.

A correlação de 49% obtida entre os métodos macroscópicos e imunohistoquímicos indica uma menor relação entre essas técnicas de diagnóstico.

Tabela III - Coeficientes de correlação e significância (P) entre as intensidades das lesões macroscópicas, microscópicas e imunomarcção pelo PAP.

Métodos	Correlação	P
Micro/ PAP	0,7716	0,0001
Macro/ Micro	0,6934	0,0001
Macro/ PAP	0,4874	0,0001

A determinação da sensibilidade e da especificidade da reação imunohistoquímica pelo PAP foi calculada a partir dos resultados das imunoreações conforme registrado na TAB.IV.

Após o cálculo da equação de acordo com o que foi preconizado por FLETCHER et al. (1986) verificou-se que a sensibilidade da técnica imunohistoquímica (PAP) foi de 95%, enquanto a especificidade desse método encontra-se situada na faixa dos 77,5%.

TABELA IV –Resultados da técnica de peroxidase anti-peroxidase (PAP), em granjas positivas e negativas para pneumonia enzoótica suína

-

	Granjas	Positivas	Negativas	Total
PAP				
Positivo		38	09	47
Negativo		02	31	33
Total		40	40	80

- Sensibilidade (S) = $38 / 38 + 02 \times 100 = 95\%$;

- Especificidade (E) = $31 / 09 + 31 \times 100 = 77,5\%$

6- DISCUSSÃO

As lesões macroscópicas observadas, consistindo de áreas de consolidação bem delimitadas, acrepitantes, de aspecto carnosos e de coloração púrpura nos lobos apicais, cardíacos e intermediários, bem como presença de exsudato catarral, mucopurulento ou purulento, foram consideradas características de pneumonia enzoótica, como descrito por GARDNER (1990), citado por HURNIK et al. (1993). OBOEGBULEN (1981) e MAES et al. (1996) observaram que essas alterações também podem estar presente com menor frequência na porção cranial dos lobos diafragmáticos.

Segundo HURNIK et al. (1993), a pneumonia enzoótica possui lesões visuais singulares e facilmente identificáveis, fazendo com que o diagnóstico macroscópico seja dotado de alta confiabilidade. Todavia, ARMSTRONG (1983), de maneira similar aos resultados obtidos no presente trabalho, verificou que a ausência de lesões macroscópicas não descarta a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*, pois, no seu material, 19% dos pulmões sem lesão aparente se encontravam infectados. No estudo em tela foi verificado que os diagnósticos macroscópicos e microscópicos demonstraram forte correlação positiva, situando-se próxima aos 70% de associação, indicando clara correspondência entre essas manifestações morfológicas. Já a avaliação entre os métodos macroscópico e imunohistoquímico revelou uma menor correlação entre essas variáveis, situada na faixa de 49%. Esse dado, à princípio, poderia indicar uma incipiente colonização pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* ainda sem manifestação

morfológica da doença, ou ainda, a existência de reações cruzadas com outros agentes biológicos, sobretudo com o *Mycoplasma flocculare*.

As lesões histológicas observadas nos fragmentos de pulmão proveniente de animais de granjas positivas para pneumonia enzoótica suína refletem diferentes fases de um processo inflamatório, ora predominando respostas francamente exsudativas, ora predominando respostas proliferativas. Um aspecto marcante e presente na maioria dos cortes histológicos de pulmões provenientes dessas granjas foi a presença de hiperplasia linfóide nas áreas perivasculares, peribronquiais e peribronquiolares, lesões essas bastante sugestivas de pneumonia enzoótica. Vários autores, como DONE (1996), MAES et al. (1996) e ROSS (1999), entre outros, têm destacado esse aspecto como altamente indicativo de lesão micoplásmica.

Os achados histológicos observados no presente trabalho, em linhas gerais, se assemelham aos descritos por ROSS (1999), segundo o qual, nos primeiros estágios da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae*, ocorre discreto aumento de células linfóides no parênquima pulmonar, principalmente na intimidade dos espaços aéreos. Adicionalmente, WITTLESTONE (1972), citado por ROSS (1999), salienta que, com o avanço da infecção, há aumento do número de linfócitos, que, para HOWARD et al. (1987); citados por ROSS 1999 poderia estar relacionado com a persistência de micoplasmas na superfície mucosa, que, nos casos mais típicos, pode determinar a formação de grandes nódulos linfóides, com conseqüente estenose de vias aéreas e colabamento alveolar.

Nos casos de lesões mais intensas, pode haver aparecimento de áreas atelectásicas, além de regiões com enfisema compensatório que se desenvolvem secundariamente às áreas de restrição do parênquima nas adjacências. Essas lesões, presentes neste trabalho, já tinham sido observadas por LIVINGSTON et al. (1972), DONE (1996), MAES et al. (1996) e por ROSS (1999).

Os fragmentos de tecido pulmonar oriundo de granjas consideradas negativas para infecção por micoplasma apresentaram-se desprovidos de evidência de processo inflamatório, com exceção de um único caso em que se fazia presente uma discreta hiperplasia linfóide no tecido pulmonar.

GINSBER e NICOLET (1973) citados por MESSIER e ROSS (1991), consideram que o contato da membrana de micoplasmas com o tecido pulmonar pode ser um fator mitogênico para linfócitos, o que poderia justificar a hiperplasia linfóide com conseqüente presença de nódulos linfóides.

Quanto aos aspectos imunohistoquímicos, verificou-se que os organismos corados pela técnica de imunoperoxidase foram identificados como estruturas pleomórficas marrons localizadas na superfície de células epiteliais de brônquios e bronquíolos, no lúmen dessas estruturas e no interior de macrófagos. Essa manifestação morfológica guarda estreita similaridade com as obtidas por BRUGGMAN (1977), LUTSKY et al. (1986) e DOSTER e LIN (1988). A esse respeito deve-se considerar que, devido à pequena dimensão do micoplasma, a imunomarcção não guarda nenhuma relação com a morfologia do agente, o que, de certa forma, dificulta os procedimentos diagnósticos.

Segundo BRUGGMAN (1977), o agente se faz presente sob a forma de colônias ou ainda distribuído ao acaso na superfície de células epiteliais. Esse autor, ao utilizar lavados bronquiais para serem analisados pela técnica de imunoperoxidase indireta, observou a presença de pontos marrons ocasionalmente distribuídos na superfície de células epiteliais descamadas.

LUTSKY et al. (1986) observaram que o depósito bronzeado na superfície epitelial era extracelular, limitada pelos cílios, onde o micoplasma exerce sua ação caracterizada por estase e perda ciliar. Observaram ainda que este depósito não era contínuo e que também poderia estar presente no interior de algumas glândulas da submucosa, fato esse também observado no presente trabalho.

De acordo com DOSTER e LIN (1988), os micoplasmas corados pela técnica da imunoperoxidase morfológicamente se apresentam como grânulos marrons, medindo em média 0,3 a 0,5 μm de diâmetro.

CHASEY e WOODS (1984) detectaram, em cultura de células, a contaminação por micoplasmas por meio da técnica de imunoperoxidase e observaram que as células contaminadas continham densos grânulos pleomórficos de coloração marrom escura intra - citoplasmaticamente. Esta foi considerada uma técnica muito útil para a detecção de culturas contaminadas por micoplasma, além de possuir a vantagem de facilidade de visualização.

Nos resultados obtidos, observou-se imunomarcção com diferentes graus de intensidade da reação, com a mesma se encontrando mais evidente nas áreas de maior lesão, de forma similar a demonstrada por BÖLSKE et al. (1989), BAR-MOSHE e RAPPAPORT (1981), GOULARD e HOWARD (1982), citados por RODRIGUEZ et al. (1996 b). Também BASHIRUDDIN et al. (1999) consideram os locais de imunomarcção mais intensa como áreas de maior concentração do antígeno, correspondendo aos locais onde se observam lesões mais desenvolvidas.

De acordo com a presença ou ausência da imunoreação nas granjas positivas e negativas, calcularam-se a sensibilidade e especificidade da técnica de Peroxidase anti-Peroxidase. Os resultados indicaram tratar-se de uma técnica de alta sensibilidade (95%), e de moderada especificidade (77,5%). Por se tratar de um anticorpo policlonal e diante da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com o *M. flocculare* a especificidade dessa técnica é questionável. A esse respeito, alguns autores têm demonstrado e enfatizado os efeitos indesejáveis dessa reação quando se busca o diagnóstico etiológico da enfermidade, tais como KWON e CHAE (1999) e MORES² (comunicação pessoal). No presente trabalho, essa indesejável reação cruzada poderia estar presente e explicar a visualização de uma discreta imunoreação em nove (22,5%) animais provenientes de granjas consideradas negativas para *Mycoplasma hyopneumoniae*.

De acordo com STRASSER et al. (1992), a infecção por *M. flocculare*, quando ocorre isoladamente, não desencadeia o aparecimento de lesões. Isso poderia justificar a ausência de lesões macro e microscópicas nos pulmões de suínos das granjas consideradas livres de pneumonia enzoótica, mesmo na presença da imunomarcção pelo PAP. Portanto, para diagnóstico seguro da pneumonia micoplásmica, deve-se associar a detecção do agente à presença de lesões morfológicas indicativas.

Nas granjas positivas, as amostras foram colhidas de áreas onde as lesões se faziam presentes, o que poderia ter aumentado a sensibilidade do método. Nesse contexto, HAINES e CHELACK (1991) salientaram que a sensibilidade

² N. Mores – Embrapa-CNSA, Concórdia- PR. Cep. 89805-286

da técnica, no que diz respeito aos microorganismos patogênicos, pode ser potencializada pela pré-seleção de cortes de tecidos lesados destinados ao exame imunohistoquímico.

De acordo com LUTSKY et al. (1986) e HILL (1978), a imunoperoxidase também é um método sensível para a demonstração de micoplasmas em secreções respiratórias quando comparada à imunofluorescência, devido à maior amplificação do cromógeno pelas moléculas de peroxidase.

Como observado, em apenas dois (5%) casos, a imunomarcagem pode estar ausente em granjas positivas, podendo ser explicado pela presença de pequena concentração de microorganismos como ocorre nalguns portadores cronicamente afetados (DOSTER E LIN, 1988).

O uso de técnicas imunohistoquímicas para a detecção de micoplasma em lesões pulmonares tem sido descrito em várias espécies, como, por exemplo, *Mycoplasma hyopneumoniae* (DOSTER e LIN, 1988) e *M. hyorhinis* em suínos (MORITA et al., 1998); *M. mycoides* em caprinos; *M. bovis* em bovinos (HILL, 1978; RODRIGUEZ et al., 1996 b; SCANZIANI et al., 1997) e *M. ovinopneumoniae* em ovinos (HAZIRAGLU et al., 1996). Na avicultura, também existem relatos do uso dessa técnica para o diagnóstico de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* (IMADA et al., 1979; RADI et al., 2000), comprovando que a imunoperoxidase é segura e específica para a identificação de micoplasmas.

RODRIGUEZ et al. (1996 a) e RODRIGUEZ et al. (1996 c), realizando técnicas de imunoperoxidase em fragmentos de pulmão de bovinos para a detecção de *M. bovis*, observaram que o agente também se encontrava na superfície do epitélio bronquiolar, no lúmen dos espaços aéreos, na parede alveolar e no citoplasma de células epiteliais e inflamatórias, embora THOMAS et al. (1987), citados por RODRIGUEZ et al (1996 a), em estudos prévios, não tenham observado esse agente intracelularmente.

No presente trabalho utilizou-se soro policlonal de coelho anti-*Mycoplasma hyopneumoniae*, sendo observada uma eventual presença de *background*, que pode levar, em alguns, casos a maior dificuldade de interpretação. A esse respeito, RODRIGUEZ et al. (1996 c), também utilizando anticorpos policlonais, observaram um moderado *background*, particularmente

associado às áreas de lesão. Constataram também a presença de moderada reação cruzada que não foi observada com a utilização de anticorpos monoclonais. Concluíram que a utilização de anticorpos monoclonais é mais eficiente do que a de policlonais para o estudo da etiologia e patogênese da pneumonia causada por micoplasmas.

A técnica da imunoperoxidase revelou ser um método rápido e concernente ao PAP, um teste comprobatório útil e vantajoso para a identificação de micoplasmas, principalmente pelo baixo custo e pelo fato de as amostras poderem ser armazenadas indefinidamente, possuindo como desvantagem apenas a ocorrência de reações cruzadas quando se utilizam anticorpos policlonais .

7- CONCLUSÕES

- A técnica Peroxidase anti-Peroxidase é um método eficiente para o diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*, pois pode ser utilizado rotineiramente em laboratórios de histopatologia, tem baixo custo e é rápido, além de permitir a visualização do agente, sendo considerado uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de pneumonia enzoótica suína.

- É uma técnica que possui grande sensibilidade, porém sua especificidade é moderada, devido à semelhança antigênica entre os *Mycoplasma hyopneumoniae* e *M. flocculare*, o que resulta na presença de reações cruzadas entre os referidos micoplasmas quando se utiliza o soro policlonal anti-*M. hyopneumoniae*.

Em função disso, a utilização de Peroxidase anti-Peroxidase para o monitoramento de pneumonia enzoótica em rebanho livre, pode não ser eficiente quando se utiliza anticorpo policlonal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGBOYE, D. S. A review of mycoplasma-induced immunosuppression. **Br. Vet. J.**, v.134, n.6, p. 556- 560, 1978.
- AHRENS, P. E FRIIS, N. F. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA Probe. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 12, n.6, p. 249- 253, 1991.
- AMASS, S. F.; CLARK, L. K.; VAN ALSTINE, W. G.; BOWERSOCK, T. L.; MURPH, D. A.; KNOX, K. E.; ALBREGTS, S.R. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* Infections in Swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 204, n.1, p. 102-7, 1994.
- ARMSTRONG, C. H. Porcine Mycoplasmas. **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Edited by Whitford, H. W.; Rosenbush, R. F.; Lauerman, L. H. Iowa State University Press/ AMES, 1994.
- ARMSTRONG, C. H.; FREEMAN, M. J.; FREEMAN, L. S. Cross- reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* – Pratical Implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. **Isr. J. Med. Sci.**, v.23, n.6, p. 654-6, 1987.

- ARMSTRONG, C. H.; SCHEIDT, A. B.; THACKER, H. L.; RUNNELS, L. J.; FREEMAN, M. J. Evaluation of Criteria for Postmortem Diagnosis of Mycoplasmal Pneumonia of Swine. **Can. J. Comp. Med.** v. 48, n. 3, p. 278-281, 1984.
- AYRES, M. AYRES JR, M., D. L., SANTOS, A. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Manaus. Sociedade civil Mamirauá, 1998. 193p.
- BASHIRUDDIN, J. B.; SANTINI, F. G.; DE SANTIS, P.; VISAGGIO, M. C.; DI FRANCESCO, G.; D'ANGELO, A.; NICHOLAS, R. A. J. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* in Tissue from an Outbreak of Contagious Bovine Pleuropneumonia by Culture, Immunohistochemistry and Polimerase Chain Reaction. **Vet. Rec.**, v. 145, n. 10, p. 271-274, 1999.
- BAUMEISTER, A.K., RUNGE, M., GANTER, M., FENESTRA, A. A.; DEL BECK, F.; KIRCHOFF, M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage Fluids of Pigs by PCR. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 36, n.7, p.1984-88, 1998.
- BRASILEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A., J., A. Métodos de Estudo em Patologia. **Patologia Geral.** 2ª Ed. Guanabara Koogan, p.7-18, 1998.
- BRUGGMANN, S.; ENBERG, B. Demonstration of *M. suis* pneumoniae in pig lungs by the enzyme-linked immunoperoxidase technique. **Vet. Rec.**, v.101, n.7, p. 137, 1977.
- CARUSO, J. P.; ROSS, R. F. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus* (Haemophilus) *pleuropneumoniae* Infections on Alveolar Macrophage Functions in Swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 2, p. 227- 231, 1990.

- CHASEY, D. & WOODS, B. Detection of Immunoperoxidase Labelled Mycoplasmas in culture by light microscopy and Electronmicroscopy. **J. Med. Microbiol.**, v. 17, n.1, p. 23-30, 1984.
- CHING-LO, S.; DAWSON, M. S.; WONG, D. M.; NEWTON, P. B.; SONODA, M. A.; ENGLER, W. F.; WANG, R. Y. H.; SHIH, J. W. K.; ALTER, H. J.; WEAR, D. J. Identification of *Mycoplasma incognitos* Infection in Patients with AIDS: an Immunohistochemical, “In Situ” Hybridization and Ultrastructural Study. **Am. J. Trop. Hyg.**, v. 41, n. 5, p. 601-616, 1989.
- CHRISTENSEN, G., SORESEN, V. E MOUSING, J. Diseases of the Respiratory System. **Disease of Swine**.8 th ed. Edited by Bárbara E. Strow, Sylvie D Allaire, Willian L. Mengueling, David J. Taylor. Iowa State University Press/ Ames, Iowa U.S.A. , p. 913- 932, 1999
- CIPRIAN, A.; CRUZ, T. A.; GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Interation with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. **Arch. Med. Res.**, v. 25, n. 2, p. 235- 239, 1994.
- CIPRIAN, A.; PIJOAN, C.; CRUZ, T.; CAMACHO, J.; TÓRTORA, J.; COLMENARES, G.; REVILLA, R. L.; GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Can. J. Vet. Res.**, v. 52, n. 4, p. 434- 438, 1988.
- DAVIES, P. R., BANHSON, P. B., GRASS, J. J., MARSH, W. E., DIAL, G. D. Comparison of Methods for Mensurement of Enzootic Pneumonia Lesions in Pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 56, n. 6, p. 709-714, 1995.
- DE ROBERTIS, E. D. P. E DE ROBERTS, JR, E. M. F. **Bases da Biologia Molecular**. Ed. Guanabara Koogan. S. A. Rio de Janeiro, R.J., 1993.

- DEBEY, M. C. E ROSS, R. F. Ciliostase and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in Porcine Tracheal Organ Cultures. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 62, n.12, p. 5312- 5318, 1994.
- DEBEY, M. C.; JACOBSON, C. D.; ROSS, R. F. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Am. J. Vet. Res.** v. 53, n. 9, p. 1705-1710, 1992.
- DJORDJEVIC, S. P.; EAMENS, G. J.; ROMALIS, L. F. SAUNDERS, M. M. An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of porcine serum antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v. 39, n. 3-4, 261-274, 1994.
- DONE, S. H. Enzootic Pneumonia (Mycoplasmosis) Revisited. **The Pig Journal**, v. 38, p. 40-61, 1996.
- DOSTER, A. R.; LIN, B. C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Formalin-Fixed Porcine Lung, Using an Indirect Immunoperoxidase Method. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, n.10, p. 1719-21, 1988.
- ETHERIDGE, J. R.; COTTEW, G. S. E LLOYD, L. C. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from Lesions in Experimentally Infected Pigs. **Aust. Vet. J.**, v. 55, v. 8, p. 356-359, 1979.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Marcadores baseados em PCR **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análises Genéticas.** 3ª ed. Brasília: Embrapa- Cenargen, 220 p, 1998.
- FLETCHER, R.H. **Epidemiologia Clínica: elementos essenciais.** 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 52-83, 1986.

- FRASER, C. M., BERGERON, J. A., MAYS, A. e AIELLO, S. E. Pneumonia por *Mycoplasma*. **Manual Merck de Veterinária**. 7th, ed. Roca, São Paulo – SP, p. 906-905, 1997.
- FREEMAN, M. J.; OSUNA, M. L.; ARMSTRONG, C. H.; FREEMAN, L. S. Evaluation of the indirect hemagglutination assay as a practical serodiagnostic test for mycoplasmal pneumonia of swine. **Vet. Microbiol.**, v. 9, n. 3, p. 259-270, 1984.
- GIMENO, E. J. Fundamentos de Inmunohistoquímica Aplicada a Patología veterinária. **7º Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, 24 a 27 de Julho de 1995, Belo Horizonte- MG, P. 17-51.
- GOODWIN, R. F. W. Apparent Reinfection of Enzootic-Pneumonia-Free Pig Herds: Search for possible causes. **Vet. Rec.**, v.116, n. 26, p. 690-694, 1985.
- GOODWIN, R. F. W. The Economics of Enzootic Pneumonia. **Vet. Rec.**, v. 89, p. 77-81, 1971.
- HAINES, D. M.; CHELACK, B. J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formaline-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 3, n.1, p. 101-112, 1991.
- HAZIROGLU, R.; DIKER, K. S.; TURKARSLAN, J.; GULBANAR, M. Y. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica* Antigens by Immunoperoxidase Technique in Pneumonia Ovine Lungs. **Vet. Pathol.**, v. 3, n.1, p.74-61, 1996.
- HILL, A. C. Demonstration of Mycoplasmas in tissue by the Immunoperoxidase Technique. **J. Infect. Dis.**, v. 137, n. 2, p. 152-155, 1978.

- HOLMGREM, N. An Indirect Haemagglutination Test for Detection of Antibodies Against *Mycoplasma hyopneumoniae* using formalinized Tanned Swine Erythrocytes. **Act. Vet. Scand.**, v. 14, n. 2, p. 353- 355, 1976.
- HSU, S. M., RAINE E FANGER, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n.4, p. 577-580, 1981.
- HURNIK, D.; HANNA, P. E.; DOHOO, I. R. Evaluation of Rapid Gross Visual Appraisal of Swine Lungs at Slaughter as a Diagnostic Screen for Enzootic Pneumonia. **Can. J. Vet. Res.**, v. 57, n.1, p. 37- 41, 1993.
- HWANG, F.; WEN, D. C.; WU, Y. W.; LI, Y. Z.; DONG, Q. H.; WANG, S. M. Studies on the Phospholipid Composition of Pathogenic Cell Membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **FEBS Lett.**, v. 195, n.1-2, p.323-6, 1986.
- IMADA, Y.; NONOMURA, I.; HAYASHI, S.; TSURUBUCHI, S. Immunoperoxidase Technique for Identification of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. **Nation. Inst. Anim. Health. Quart.**, v. 19, n. 1-2, p. 40-46, 1979.
- INTRAKSA, Y.; ENGEN, R. L.; SWITZER, W. P. Pulmonary and hematologic changes in swine with *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v. 45, n.3, p. 474 - 477, 1983.
- JACQUES, M.; BLANCHARD, B.; FOIRY, B.; GIRARD, C.; KOBISCH, M. In Vitro Colonization of Porcine Trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Ann. Res. Vet.**, v. 23, n. 3, p. 239 -47, 1992.

- JOHNSON, H. M.; RUSSEL, J. K.; PNTZER, C. H. Superantigens in Human **Dis. Sci. Am.**, April, p. 42-48, 1972.
- KAHANE, I.; RAZIN, S. Immunological Analysis of Micoplasma Membranes. **J. Bacteriol.**, v. 100, n. 1, p. 187- 194, 1969.
- KAZAMA, S.; YAGIHASHI, T. R. E SETO, K. Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* Antigen for the Enzime- Linked Immunosorbent Assay. **Can. J. Vet. Res.** v. 53, n. 2, p. 176-181, 1989.
- KIRK, C. L. Respiratory Therapy-Implementing Cost Effetive Regimens. **Swine Disease Conference for Swine Practitioners**, Iowa State University Ames, I.A., v. 14-15,p. 83-87, 1996.
- KISHIMA, M.; ROSS, R. F. Supressive effect of noviable *Mycoplasma hyopneumoniae* of phytohemagglutinin-induced transformation of swine lymphocytes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, n.11, p. 2366-8, 1985.
- KOBISCH, M. E FRIIS, N. F. Mycoplasmosis porcinas. **Ver. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 15, n. 4, p. 1569-1606, 1996.
- KOBISCH, M.; NICOLET, J. Comparison of Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) and Indirect Hemagglutination (IHA) in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of pigs. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, n.6, p. 644- 646, 1987.
- KWON, D. E CHAE, C. Detection and Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in Lungs from Naturally Infected Pigs by in Situ Hibridization Using a Dioxigenin-Labeled Probe. **Vet. Pathol.**, v. 36, n. 4, p. 308-313, 1999.

- L'ECUYER, C.; BOULANGER, P. Enzootic Pneumonia of Pigs: Identification of a causative Mycoplasma in Infected Pigs and cultures by Immunofluorescent Staining. **Can. J. Comp. Med.**, v. 34, n.1, p. 38-46, 1970.
- LE POTIER, M. F.; ABIVEN, P.; KOBISCH, M. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Res. Vet. Sci.**, v. 56, n. 3, p. 338 - 345, 1994.
- LIVINGSTON, C. W.; STAIR, E. L.; UNDERDAHL, N. R.; MEBUS, C. A. Pathogenesis of Micoplasmal Pneumonia in Swine. **Am J. Vet. Res.**, v. 33, n. 11, p. 2249- 2258, 1972.
- LEVONEN, K. Detection of enzootic pneumonia in pig herds using an enzyme-linked immunosorbent assay in sow colostrum. **Res. Vet. Sci.**, v. 56, n. 1, p. 111-113, 1994.
- LORDEN, L. (2000). Chronic Fatigue Syndrome. wysiwyg://2/file:/A/mycop.htm.
- LUTSKY, I., LYVNI, N., MOR, N. Retrospective Confirmation of Mycoplasma Infection by the Immunoperoxidase Technique. **Pathology.**, v.18, n.4, p. 390-392, 1986.
- MAES, D., VERDONCK, M., DELUYKER E DE KRUIF, A. Enzootic Pneumonia in Pigs. **Vet.Quart.**, v. 18, n. 3, p. 104-9, 1996.
- MCKEAN, J. D.; ANDREWS, J. J. E FARRITON, D. O. Evaluation of Diagnostic Procedures for Detection of Mycoplasmal Pneumonia of Swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 174, n.2, p. 177-80, 1979.

- MERINO, N. E MARTÍNEZ, J. J. Métodos Rápidos de Imunoperoxidasa para el Diagnóstico de Enfermedades Virales. **Rev. Salud. Anim.**, v. 10, n.4, p. 357 - 361, 1988.
- MESSIER, S., ROSS, R. F. Interations of *Mycoplasma hyopneumoniae* membrana with porcine lymphocytes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, n. 9, p. 1497 – 1502, 1991.
- MIMS, C.A., PLAYFAR, J. H., ROIT, I. M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. Estratégias para a sobrevivência dos parasitas e persistência da infecção. **Microbiologia Médica**. 1ª Edição, Ed. Manole, São Paulo, S.P., p. 15.1 – 15.12, 1995.
- MOLINA, J. R., WILLIAMS, J. J., RUIZ, E. G. Identificación de Granjas Seropositivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* y Exploración de Potenciales Factores de Riesgo Relacionados a su Presentación en 33 Granjas Porcinas del Estado de Yucatán, México. **Rev. Biomed.**, v. 9, p. 167-175, 1998.
- MORALES, J. C. Técnicas estruturales. Histología y citología. **Técnicas de Diagnostico in Virología**. Ed. Diaz de Santos, S. A. Madrid (Espanha), p. 207-237, 1993.
- MORENO, A. M.; BARBARINI JUNIOR, O.; BACCARO, M. R. Levantamento Sorológico para *Mycoplasma hyopneumoniae* em Criações de Suínos no Período de Dezembro de 1996 a Julho de 1999. **IX Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos**, 26 a 29 de Outubro de 1999, Belo Horizonte - MG, p.161-162.

- MORITA, T.; SASAKI, A.; KAJI, N.; SHIMADA, A.; KAZAMA, S.; YAGIHASHI, T.; UEMURA, T. Induction of Temporary Otitis Media in Specific-Pathogen-Free Pigs by intratympanic Inoculation of *Mycoplasma hyorhinis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 59, n.7, p. 869-873, 1998.
- MORRIS, C. R., GARDNER, I. A., HIETALA, S. K. AND CARPENTER, T. E. Enzootic Pneumonia: Comparison of Cough and Lung lesions as Predictors of Weight in Swine. **Can J Vet Res.**, v. 59, p. 197-204, 1995.
- NICOLET, J.; PAROZ, P. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. **Res. Vet. Sci.**, v. 29, n. 3, 305- 309, 1980.
- OBOEGBULEN, S. I. Enzootic Pneumonia of Pigs: A Review. **Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.**, v. 29, n. 3, p. 269-274, 1981.
- OKADA, M.; ASAI, T.; ONO, M.; SAKANO, T.; SATO, SHIZUO. Cytological and Immunological Changes in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Histological Observation of Lung Lesions in Pigs Immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* Inactivated Vaccine Prepared from Broth Culture Supernate. **Vacc.**, v.18, n.25, p.2825- 2831, 2000.
- PIFFER, I. A.; BRITO, J. R. F. Pneumonia em Suínos. **Periódico Técnico-informativo/Embrapa- CNPSA**, Junho, p: 1-6.,1993.
- PIFFER, I. A.; ROSS, R. F. Effect of Age on Susceptibility of Pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, n.3, p. 478-81, 1984.
- POINTON, A. M., BYRT, D. and HEAP, P. Effect of Enzootic Pneumonia of Pigs on Growth Performace. **Aust. Vet. J.**, v. 62, n.1, p. 13-18, 1985.

- POLAK, A.A.; HAGENAARS, R.; Nagel, J. Evaluation of an Indirect Immunoperoxidase Test for Identification of *Archaeoplasma* and *Mycoplasma*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 106, n. 2, p. 241 -249, 1978.
- POTGIETER, L. N. D.; ROSS, R. F. Identification of *Mycoplasma hyosynoviae* by immunofluorescence. **Am. J. Vet. Res.**, v. 33, n. 1, p. 91 - 98, 1972.
- PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology**. Washington, 1992, 274 p.
- RADI, Z. A.; TRAMPEL, D. W.; SMITH, B. S.; ROSEN BUSCH, R. F.; GOLL, F. Immunohistochemical Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Antigens in Turkey Respiratory Tissues. **Avian. Dis.**, v. 44, n. 2, p. 399 -407, 2000.
- RODRÍGUEZ, F.; BRYSON, D. G.; BALL, H. J. E FORSTER, F. Pathological and Immunohistochemical Studies of Natural and Experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. **J. Comp. Pathol.** 115 (2): 151-162, 1996 c.
- RODRIGUEZ, J. L.; BROOKS, D. L.; DAMASSA, A. J.; OROS, J.; FERNANDEZ, A. Immunohistochemical Characteristics of *M. capricolum* subsp. *capricolum* in Caprine Abortion. A Case Report. **Theriogenol.**, v. 46, p. 379-385, 1996 a.
- RODRÍGUEZ, J. L.; OROS, J.; RODRÍGUEZ, F. POVEDA, J. B.; RAMÍRES, A E FERNANDEZ, A . A . Pathological e Immunohistochemical Study of Caprine Pleuropneumonia Induced by Subspecies of *Mycoplasma mycoides*. **J. Comp. Path.** 114, (4): 373-384, 1996 b.

- ROSENBUCH, R. F. Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Edited by Whitford, H. W.; Rosenbush, R. F.; Lauerman, L. H. Iowa State University Press/ AMES, 1994.
- ROSS, R. F. Mycoplasmal Diseases. **Disease of Swine**. 8 th ed., p. 495-509. Edited by Bárbara E. Strow, Sylvie D allaire, Willian L. Mengueling, David J. Taylor. Iowa State University Press/ Ames, Iowa U.S.A,1999.
- ROSS, R. F.; STEMKE, G. W. Mycoplasma Infections of Swine. **Molecular and Diagnostic Proccedures in Mycoplasmology**. Ed. Academic Press, edited by Tully, J. G. e Razin, S., v. 2, p. 275 -281, 1995.
- ROSTAGNO, M. H.; REIS, R.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, J. L. Estudo da Associação entre Doenças Respiratórias em Suínos através do Monitoramento ao Abate. **IX Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 26 a 29 de Outubro de 1999, Belo Horizonte- MG, p. 167-8.
- SCANZIANI, E.; PALTRINIERI, S.; BOLDINI, M.; GRIECO, V.; MONACI, C.; GIUSTI, A. M. R. E MONDELLI, G. Histological and Immunohistochemical Findings in Thoracic Lymph Nodes of Cattle with Contagious Bovine Pleuropneumonia. **J. Comp. Path.**, v. 117, n. 2, p.127-136, 1997.
- SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. A.; FREITAS, A. R. Impacto de Doenças Respiratórias dos Suínos nos Sistemas de Produção do Estado de Santa Catarina. **Comunicado Técnico- Embrapa- CNPSA**, 123, Setembro, p: 1-4,1987.

STEVENSON, G. W. Bacterial Pneumonia in Swine. **Proceedings of the 15 th IPVS Congress**, Birmingham, England, 5-9 July, p. 906- 907, 1998.

STRASSER, M.; ABIVEN, P.; KOBISCH, M. NICOLET, J. Immunological and Pathological Reaction in Piglets Experimentally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 31, n.1-2, p. 141-3, 1992.

TAJIMA, M.; YAGIHASHI, T.; NUNOYA, T.; TAKEUCHI, A.; OHASHI, F. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in Pigs Immunosuppressed by Thymectomy and Treatment with antithymocyte serum. **Am. J. Vet. Res.**, v. 45, n. 10, p.1928 -32, 1984.

THACKER, E. L., HALBUR, P.G., ROSS, R. F. THANA WONGNWECH, R., THACKER, B. J. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive e Respiratory Syndrome Virus- Induced Pneumonia. **J. Clín. Microbiol.**, v. 37, n.3, p. 620 -627, 1999.

THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; JANKE, B. H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine Influenza Vírus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.7, p. 2525-30, 2001.

THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; YOUNG, T. F.; HALBUR, P. G. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) – induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vacc.**, n. 18 (13): 1244-52, 2000.

THANAWONGNUWECH, R.; YOUNG, T. F.; THACKER, B. J.; THACKER, E. L. Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 79, n.1-2, p. 115- 127, 2001.

- TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J., H.; SCOTT, F. W. E BARLOUG, J. E. The Mycoplasmas. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infections Disease of Domestic Animals**. 8th ed. EUA, Cornell University Press. p. 309-310, 1992.
- WALLIS, A. S.; THOMPSON, G. W. The evaluation of a Complement Fixation Test for the Diagnosis of Porcine Enzootic Pneumonia. **Vet. Rec.**, v. 85, n.14, p. 573- 577, 1969.
- YAGIHASHI, T., NUNOVA, T., MITUI, T. E TAGIMA, M. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* Pneumonia in Pigs. **Jpn. J. Vet. Sci.** v. 46, n.5, p. 705-713, 1984.
- YAMAMOTO, R. Mollicutes. **Tratado de Microbiología Veterinária**. 1 st ed., p. 241-249. Edited by Bibertein, D. V. M. e Yuan Chun. Zee, D. V. M. Scool of Veterinary Medicine University of California, Davis, 1994.
- YOUNG, T. F.; THACKER, E. L.; ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F. A Tissue Culture System to Study Respiratory Ciliary Epithelial Adherence of Selected Swine Mycoplasmas. **Vet. Microbiol.**, v. 71, n.3-4, p.269- 279, 2000.
- ZANG, Q.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F. Glycolipid Receptors for Attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine Respiratory Ciliated Cells. **Infect Immun.**, v. 62, n.10, p. 4367-73, 1994.
- ZANG, Q.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F. Identification and Characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* Adhesin. **Infect Immun.** v. 63, n. 3, p. 1013-9, 1995.
- ZIELINSKI, G. C. E ROSS, R. F. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Porcine Ciliated Respiratory Tract Cells. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n.8, p. 1262-1269, 1993.