Este estudo testou a efetividade de uma vacina monovalente para o vírus A(H1N1)pdm09 quanto à resposta humoral, ocorrência de lesões e interação entre a patologia e patógenos no Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos. Foram avaliados 420 suínos, divididos em quatro grupos testando os adjuvantes Emulsigen - D® e Hidróxido de Alumínio. Foram realizadas avaliações zootécnicas, clínicas, sorológicas, moleculares, patológicas e imuno-histoquímicas. O adjuvante Emulsigen - D® apresentou melhor resposta humoral. A lesão mais frequente foi consolidação pulmonar crânio-ventral e na histopatologia, pneumonia broncointersticial associada à hiperplasia de BALT.

Orientador: Aldo Gava

Lages, 2016

ANO
2016

NATALHA BIONDO |ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA O VÍRUS INFLUENZA A

UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA O VÍRUS INFLUENZA A

NATALHA BIONDO

LAGES, 2016

NATALHA BIONDO

ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA O VÍRUS INFLUENZA A

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito à obtenção do grau de Doutor na área de concentração de Patologia Animal.

ORIENTADOR: ALDO GAVA

LAGES

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Biondo, Natalha
ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA O VÍRUS INFLUENZA A / Natalha Biondo. Lages - 2016.
138 p.

Orientador: Aldo Gava
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Complexo de doenças respiratórias dos suínos. 2. Vacinação. 3. Pneumonia. 4. Mycoplasma hyopneumoniae. 5. Circovirus Suíno tipo 2. I. Gava, Aldo. II. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

NATALHA BIONDO

ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA O VÍRUS INFLUENZA A

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito à obtenção de grau de Doutor na área de concentração de Patologia Animal.

Banca examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr Aldo Gava
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

_____
Prof. Dr. David Driemeier
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

_____
Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina

_____
Prof. Dr. José Cristani
Universidade do Estado de Santa Catarina

_____
Prof. Dr. Paulo Eduardo Bennemann
Universidade do Oeste de Santa Catarina

LAGES

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Aos meus pais Mauro e Odete pelo apoio, simplicidade e honestidade. Ao meu irmão Mauro Maurício pela amizade e animação de sempre. A Monalisa De Prá pelo carinho e atenção. Agradeço a torcida e esforço em minimizar minhas angústias;

Ao Valdomiro Genari "Vavá" por fazer valer a definição de companheirismo e por ser um incansável incentivador. Por todo carinho, palavras de coragem, por entender minhas ausências e me acolher em seu abraço;

Ao meu orientador prof. Aldo Gava pela confiança depositada e por ter aceitado o desafio de me orientar mesmo sem dedicação exclusiva. Por todos os ensinamentos compartilhados, pela simplicidade e objetividade com que nos ensina um assunto apaixonante e complexo chamado patologia;

A Embrapa Suínos e Aves pela parceria no desenvolvimento do projeto e a todos os funcionários que colaboraram nas diferentes etapas da execução, e em especial:

A Janice Zanella pelo apoio e atenção;

Ao Arlei Coldebella pela análise estatística;

A Vanessa Haach por toda paciência, ajuda incansável e por ser um "cérebro pensante" nas atividades do experimento;

A Lucia Cano pela ajuda e bons momentos divididos;

Aos funcionários do SPS e em especial ao Cleiton Schuck, que auxiliaram nas atividades de granja. Aos funcionários do setor de necropsia – Dejalmo da Silva e Altair Althaus e ao Luis Carlos Ajala pelas atividades de frigorífico;

A Neide Simon e Marisete Schiochet que não mediram esforços para nos auxiliar nas atividades moleculares e sorológicas no laboratório de virologia;

Ao Nelson Morés e Marcos Morés por terem cedido os controles positivos de *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV2 e influenza vírus. Ao Marcos Morés também por ter auxiliado e esclarecido minhas dúvidas ao longo da padronização das técnicas de imuno-histoquímica. A Franciele Ianiski por ser prestativa e atenciosa;

A Franciana Bellaver e Raquel Rebellato pela execução das PCRs de *M. hyopneumoniae* e *P. multocida*;

A Danielle Gava, amiga especial! Não há palavras para expressar tamanha gratidão. Uma pessoa por quem tenho uma grande admiração e carinho. Por estar presente com palavras de conforto em momentos difíceis e turbulentos, e por partilhar de momentos felizes. Por sanar todas as dúvidas, pelos inúmeros ensinamentos e por estar sempre disposta a ajudar. Profissional exemplar!

A Rejane Schaefer pela amizade, por toda disponibilidade de tempo, paciência, clareza com que ensina. Por ser um grande exemplo profissional e por me mostrar que com dedicação e perseverança tudo é possível;

A todos os professores da UDESC pelos ensinamentos ao longo do curso;

Ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA-UDESC) por me acolher e proporcionar tamanho aprendizado. As professoras Sandra Traverso e Renata Casagrande, pelo apoio. Aos colegas: mestrandos, doutorandos, estagiários e bolsistas pelos aprendizados e momentos de convívio. Agradeço especialmente aqueles que entendiam que à distância nos impede de executar algumas atividades e sempre estiveram à disposição para auxiliar. As funcionárias do setor da patologia Sandra Floriani e Iane Santos.

Pelos amigos que conquistei durante esta fase, em especial a Carina Freccia e Angela Pelizza por terem dividido seu espaço comigo;

Ao curso de Medicina Veterinária da Unoesc Campus Xanxerê, em especial aos estagiários e monitores do Laboratório de Patologia Veterinária, agradeço o auxílio e compreensão nas minhas ausências e por terem executado parte das atividades de processamento do material para diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. Agradeço especialmente: Ana Carla Marquezzan, Anderson Radavelli, Camila Pagotto, Daiane Cadore, Dyovana Martinelli, Fernanda Ribeiro, Marina Gheller, Rafael Toazza, Talita Valentini, Tanaíza Rigo e Valdirene Zabot.

A UDESC que serviu como base para aquisição de conhecimento e ao CNPq pelo financiamento de parte do projeto.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta.

Faça da pedra de tropeço, um degrau de subida. Transforme cada fato negativo, em uma experiência positiva. (Bruce Lee)

RESUMO

O complexo de doenças respiratórias dos suínos (CRDS) resulta de uma miscelânea de fatores e é um dos maiores e mais frequentes desafios na produção e sanidade de suínos. Este estudo testou a efetividade de uma vacina monovalente para o vírus A(H1N1)pdm09 quanto à resposta humoral, ocorrência de lesões e interação entre a patologia e patógenos no CDRS. Para tanto, foram avaliados entre os meses de Janeiro a Junho, quatrocentos e vinte suínos foram divididos em quatro grupos (n= 105 cada grupo): Grupo 1 (G1) controle com aplicação de PBS; Grupo 2 (G2) vacinado com duas doses de vacina com adjuvante Emulsigen - D®; Grupo 3 (G3) vacinado com duas doses de vacina com adjuvante hidróxido de alumínio; Grupo 4 (G4) vacinado com uma dose de vacina contendo adjuvante Emulsigen - D®. A vacina foi produzida na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) a partir do vírus A(H1N1)pdm09 oriundo de uma granja em Santa Catarina com caso de doença respiratória. A vacinação deu-se pela via intramuscular na fase de creche, aos 35 e 55 dias de idade. Durante o período experimental foram realizadas avaliações zootécnicas (ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração) e clínicas (contagem de tosse e espirro) semanais e colheitas de sangue aos 21, 35, 56, 77 e 98 dias de idade. Uma amostragem dos animais foi necropsiada aos 70 e 126 dias e o restante foi avaliado por ocasião do abate (156 dias de idade). Amostras pulmonares foram colhidas para avaliação histológica, imuno-histoquímica e molecular. Os suínos do G2 foram os que apresentaram melhor resposta humoral à vacinação. A consolidação pulmonar crânio-ventral, especialmente no lobo cardíaco, foi o padrão de lesão macroscópica mais frequente nos grupos testados. Na microscopia a pneumonia broncointersticial associada à hiperplasia de BALT foi observada na maioria dos pulmões e teve relação com a detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* por

técnicas moleculares e imuno-histoquímica. O vírus influenza circulou no rebanho em pelo menos dois momentos ocasionando uma infecção sub-clínica. Foi possível identificar o vírus em pequenas quantidades no pulmão com o uso de técnicas moleculares, entretanto, sem lesão compatível com infecção na histopatologia. Outro agente frequentemente identificado foi o PCV2, e, na maior parte dos casos associado com *M. hyopneumoniae*. A partir das observações conclui-se que duas doses da vacina com o adjuvante Emulsigen - D® apresentou melhor capacidade de induzir a resposta humoral, e, pela frequência de lesões macroscópicas e histológicas, as pneumonias são altamente prevalentes, mesmo em um rebanho com controle ambiental, bom manejo e com protocolo de vacinação que inclui *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A.

Palavras-chave: Vacinação. Complexo de doenças respiratórias dos suínos. Pneumonia. *Mycoplasma hyopneumoniae*. Circovirus Suíno tipo 2.

ABSTRACT

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is one of the most important health concern for swine producers**.** This study tested the effectiveness of a monovalent A(H1N1)pdm09 vaccine, evaluating the humoral response, lesions occurrence and the interaction between pathology and pathogens in the PRDC. Therefore, four hundred and twenty pigs were divided in four groups, (n= 105): Group 1 (G1) PBS control; Group 2 (G2) vaccinated with two vaccine doses with an Emulsigen - D® adjuvant; Group 3 (G3) vaccinated with two vaccine doses with aluminum hydroxide adjuvant; Group 4 (G4) vaccinated with one vaccine dose with Emulsigen - D® adjuvant and evaluated between January to June. The vaccine was produced at Embrapa Swine and Poultry (Concórdia – SC) with A(H1N1)pdm09 virus isolated from a clinical case of respiratory disease in a farm in Santa Catarina. The vaccination was done by intrammuscular route at nursery stage, at 35 and 55 days of age. During the experimental period, zootecnic evaluations (weight gain, feed conversion ratio and feed intake) and clinical monitoring (number of cough and sneeze) were performed weekly. Blood samples were collected at 21, 35, 56, 77 and 98 days-old. Some animals were necropsied at 70 and 126 days and the remaining pigs were evaluated at slaughter (156 days of age). Lungs were macroscopically evaluated and samples were taken for histological, immunohistochemical and molecular analysis. Pigs from G2 showed better humoral response to vaccination. The cranio-ventral lung consolidation, particularly in cardiac lobe, was the most frequent macroscopic lesion observed, except for G1 that showed lower incidence of gross lesions. In microscopy, broncointersticial pneumonia associated to BALT hyperplasia was observed in most lungs and was related to *M. hyopneumoniae* detection by molecular and

immunohistochemical techniques. Influenza A virus circulated in the herd for at least two times, but resulting in a subclinical infection. It was possible to identify the virus in small amount in the lung by molecular techniques, however no lesion were observed in the histopathology. Another frequently agent identified was PCV2, and in the most cases it was associated with *M. hyopneumoniae.* Based on that, the use of two vaccine doses with an Emulsigen - D® adjuvant showed better humoral response. The frequency of macroscopic and histological lesions demonstrated that pneumonia are highly prevalent even in a herd with environmental control, good management and with a vaccination protocol including *M. hyopneumoniae*, PCV2 and influenza A virus.

Key-words: Vaccination. Porcine respiratory disease complex. Pneumonia. *Mycoplasma hyopneumoniae*. Circovirus Swine type 2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Delineamento experimental - Atividades desenvolvidas e data de colheita de amostras nas fases de creche, crescimento e terminação. 63

Figura 2 Diagrama esquemático da distribuição das baias e grupos/tratamento nas salas de creche (A) e crescimento-terminação (B) de acordo com o lote. 64

Figura 3 Ficha de acompanhamento de necropsia com descrição de lesões pulmonares e extra-pulmonares. 71

Figura 4 Temperatura média semanal (máxima e mínima) dentro da instalação da fase de crescimento e terminação. 79

Figura 5 Animais positivos no teste de ELISA – NP nos diferentes momentos, desde o desmame até 98 dias de vida 84

Figura 6 Lesão de consolidação vermelho-escura bem delimitada com localização crânio-ventral (A) e atingindo lobo caudal (B). 91

Figura 7 Corte histológico de pulmão com broncopneumonia supurativa e infiltrado de macrófagos e neutrófilos na luz alveolar. Objetiva de 20X. 95

Figura 8 Corte histológico de pulmão com hiperplasia de BALT intensa. Objetiva de 20X. 96

Figura 9 Frequência de lobos acometidos por lesões macroscópicas (consolidação) e histológicas 97

Figura 10 Frequência (%) de amostras positivas para FLUAV, *M. hyopneumoniae* e PCV2 detectadas por técnicas moleculares aos 70, 126 e 156 dias (abate). 98

Figura 11 Frequência de agentes e associação destes detectados por técnicas moleculares nos suínos avaliados independente do grupo e momento de avaliação. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Casualização de grupos de acordo com a distribuição dos animais por sexo, peso e idade ao desmame. 75

Tabela 2 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – Conversão alimentar acumulada e consumo ração diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões..... 76

Tabela 3 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – peso e ganho de peso diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões. 78

Tabela 4 Médias e erros-padrão de espirro em função do grupo e da idade dos leitões. 80

Tabela 5 Médias e erros-padrão de tosse em função do grupo e da idade dos leitões. 82

Tabela 6 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 70 dias – Necropsia 1..... 85

Tabela 7 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 126 dias – Necropsia 2 87

Tabela 8 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais abatidos aos 156 dias. 89

Tabela 9 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais necropsiados aos 70 dias. 92

Tabela 10 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais necropsiados aos 126 dias. 93

Tabela 11 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais abatidos aos 156 dias. 94

Tabela 12. Porcentagem de pulmões positivos na RT-qPCR para influenza, qPCR para circovirus suíno tipo 2 e PCR e imuno-histoquímica para *M. hyopneumoniae*. Nos parênteses, números de pulmões positivos em relação aos avaliados, em função do grupo para animais necropsiados aos 70 e 126 dias e abatidos aos 156 dias..... 99

Tabela 13 Porcentagem de suínos positivos nas técnicas de IHQ para *M. hyopneumoniae* e moleculares para *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A de acordo com o tipo e graduação das lesões microscópicas no pulmão. 101

Tabela 14 Porcentagem de suínos positivos nas técnicas de IHQ para *M. hyopneumoniae* e moleculares para *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A de acordo com o diagnóstico morfológico independente do grupo e momento. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	micromêtro
AD	Lobo apical direito
AE	Lobo apical esquerdo
BALT	Tecido linfoide associado aos brônquios
BEI	2-bromoetilamina bromidrato
CD	Lobo cardíaco direito
CE	Lobo cardíaco esquerdo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
cm	centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D	Lobo diafragmático direito
D0	dia zero – primeiro dia das atividades experimento
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELISA-NP	Ensaio imunoenzimático para nucleoproteína
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLUAV	Vírus Influenza A
G1	Grupo controle - utilizando PBS (Solução Salina Fosfatada Tamponada) - 2 doses – 35 e 55 dias de idade
G2	Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - 2 doses – 35 e 55 dias de idade
G3	Vacinação A(H1N1)pdm09 + Hidróxido alumínio - 2 doses – 35 e 55 dias de idade
G4	Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - Dose única aos 35 dias de idade
GRSC	Granja de Reprodutores Suínos Certificada
H	hora
H&E	hematoxilina e eosina

HA	Hemaglutinina
HI	Inibição da hemaglutinação
I	Lobo intermediário
IPP	Índice para Pneumonia
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IM	Intramuscular
LAPA	Laboratório de Patologia Animal
MDCK	Madin-Darby canine kidney
Mhyo	*Mycoplasma hyopneumoniae*
mL	mililitro
mm	milímetros
m^2	metros quadrados
NA	Neuraminidase
PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
PCV2	Circovirus suíno tipo 2
pdm	pandêmico
PRDC	Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos
PRRSV	Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real quantitativa
SPF	*Specific pathogen free*
SPS	Sistema de produção de suínos
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VAERD	Doença Respiratória Exacerbada Associada à Vacinação

LISTA DE SÍMBOLOS

® – marca registrada
% – Porcentagem
ºC – graus Celsius

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 35

1.1 OBJETIVOS 37

1.1.1 **Objetivo Geral** 37

1.1.2 **Objetivos Específicos** 37

2 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 38

2.1 PNEUMONIAS EM SUÍNOS: DESTAQUE AO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS 38

2.2 INTERAÇÃO ENTRE PATÓGENOS NO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS 39

2.2.1 **Influenza A** 43

2.2.2 ***Mycoplasma hyopneumoniae*** 50

2.2.3 **Circovirus Suíno Tipo 2** 52

2.4 PREVENÇÃO DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS – USO DE VACINAS 55

3 **MATERIAL E MÉTODOS** 59

3.1 PREPARAÇÃO DA VACINA 59

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – TESTE DA VACINA A CAMPO 60

3.2.1 **Manejos de ambiência e sanitários** 64

3.2.2 **Manejo nutricional** 65

3.2.3 **Pesagens** 66

3.2.4 **Monitoria na granja e colheita de amostras biológicas** 66

3.2.4.1 *Monitorias clínicas* 66

3.2.4.2 *Colheita de sangue* 67

3.2.4.3 *Colheita de secreção nasal* 67

3.2.4.4 *Colheita de tecidos* 67

3.2.5 **Análises Laboratoriais** 69

3.2.5.1 *Teste de ELISA - NP e inibição da hemaglutinação* 69

3.2.5.2 *Reação de PCR convencional e RT-PCR quantitativa em tempo real* 69

3.2.5.3 *Avaliação Anatomopatológica* 70

3.2.5.4 *Exame Imuno-histoquímico* 72

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 73

4 **RESULTADOS** 75

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 75

4.2 ATIVIDADES NA GRANJA 76

4.2.1 **Avaliação zootécnica** 76

4.2.2 **Controle da temperatura das instalações** 79

4.2.3 **Monitoria clínica** 80

4.2.4 **Análises sorológicas** 80

4.2.4 **Caracterização Etiopatológica** 83

4.3 INTERAÇÃO LESÃO E ETIOLOGIA 100

5 **DISCUSSÃO** 104

6 **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 119

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121

1 INTRODUÇÃO

Pneumonia é uma inflamação pulmonar de ocorrência frequente na suinocultura e responsável por consideráveis perdas econômicas e produtivas em animais nas fases de crescimento e terminação. Quando acomete os suínos, se apresenta como quadros complexos de doença respiratória e são resultantes da combinação de agentes infecciosos, desafios ambientais e do sistema de produção. Esta miscelânea de fatores que atuam na etiologia e patologia pulmonar é denominada de Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (PRDC). O diagnóstico definitivo só é possível mediante análises laboratoriais, pois a sintomatologia clínica é inespecífica e as infecções na grande maioria dos casos são mistas, com ação de agentes primários e secundários.

Estas patologias, além de prejuízos diretos com mortalidade de animais, também afetam o desempenho, acarretando em perdas na conversão alimentar e no ganho de peso diário e, consequentemente, maior tempo de alojamento. Outros gastos incluem aumento no uso de medicação, mão de obra e até mesmo, perdas para a indústria que processa o produto.

Embora a literatura mencione o *Mycoplasma hyopneumoniae* como importante agente primário do PRDC, a partir de 2009, com o surgimento do vírus Influenza A(H1N1)pdm09 este cenário modificou-se (LANGE et al., 2009; MORÉS et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011; WATANABE et al., 2012). Atualmente nos quadros complexos de pneumonia há interação conjunta do vírus influenza A, *M. hyopneumoniae* e circovirus suíno tipo 2 (PCV2) como agentes primários e *Pasteurella multocida* como secundário, apesar de seu papel como agente primário já ter sido estabelecido no Brasil (KICH et al., 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2015).

Dentre as possíveis ações profiláticas para minimizar o impacto do PRDC, o uso de vacinas é uma alternativa

importante. A utilização de vacinas para patógenos primários como *M. hyopneumoniae* e PCV2 é prática rotineira nas granjas e os protocolos de vacinação para agentes oportunistas são estabelecidos dependendo do padrão sanitário e pressão de infecção de cada propriedade. A vacinação para o vírus influenza não é realizada rotineiramente nas granjas, sendo que a primeira vacina comercial foi liberada para uso no Brasil no ano de 2014, e é baseada no subtipo viral A(H1N1)pdm09. Quando na decisão do uso da vacinação para influenza, alguns pontos tem que ser avaliados, como por exemplo, considerar a variabilidade genética do vírus e saber quais vírus influenza circulam nos rebanhos, pois as vacinas não protegem contra subtipos heterólogos (THACKER & JANKE, 2008; GAUGER et al., 2011; CHEN et al., 2012; GAUGER et al., 2012; VINCENT et al., 2012; RAJÃO et al., 2014a; SANDBULTE et al., 2015). Uma possível alternativa são as vacinas autógenas, porém devem-se considerar alguns detalhes na viabilidade do uso deste tipo de medida profilática. No que se refere ao custo-benefício, à produção das vacinas autógenas é mais rápida que as comerciais, principalmente pelas questões legais (Instrução Normativa DAS n°31, 20/05/2003 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), e, devido à possibilidade do agente sofrer mutações, quanto menor o tempo mais benéfico. Ainda, a efetividade da vacina tem que ser levada em consideração, visto que não há efeito heterólogo e, se caso os animais se infectarem com subtipo diferente daquele da vacina não haverá proteção (CHEN et al., 2012; SANDBULTE et al., 2015).

Mesmo que não impeça a infecção, o uso da vacinação para patógenos do PRDC auxilia no controle e prevenção das infecções respiratórias. A vacinação diminui a ocorrência de sinais clínicos e lesões, reduzindo as perdas em desempenho e gastos com tratamento da doença clínica. Ainda, esta alternativa profilática reduz os efeitos dos agentes primários diminuindo assim, as chances do aparecimento dos agentes secundários.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

*Avaliar a ocorrência do quadro complexo de doenças respiratórias do suíno e elucidar a interação entre patologia e patógenos em leitões vacinados para influenza A.

1.1.2 Objetivos Específicos

*Comparar dois diferentes adjuvantes e protocolos de vacinação (número de doses) quanto à resposta vacinal humoral;

*Avaliar a eficácia da vacinação para influenza A na diminuição da ocorrência de patologias pulmonares oportunistas;

*Elucidar a complexidade e a interação dos patógenos e fatores associados ao PRDC em animais vacinados para influenza A;

*Verificar a ocorrência de infecções pulmonares mistas e caracterizar os quadros clínico-patológicos;

*Associar a etiologia com achados de histopatologia do PRDC utilizando técnicas moleculares e imuno-histoquímicas;

* Avaliar a eficácia da vacinação para influenza A na melhoria zootécnica – ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PNEUMONIAS EM SUÍNOS: DESTAQUE AO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS

As doenças respiratórias têm destaque devido aos quadros complexos e às perdas econômicas relacionadas. Estas doenças advêm de inúmeros fatores que incluem desde os patógenos envolvidos, suscetibilidade animal, falhas de manejo até condições ambientais. Estas particularidades dificultam seu controle e diagnóstico definitivo, predispondo a uma maior ocorrência nos rebanhos. O diagnóstico definitivo das doenças respiratórias não é possível avaliando apenas o histórico e sinais clínicos, necessita da necropsia e da realização de exames complementares devido à complexidade dos quadros (KIM; CHUNG; CHAE, 2003; BOCHEV, 2007; PALZER et al., 2008; HANSEN et al., 2010; DEBLANC et al., 2012; THACKER & MINION, 2012; WILSON et al., 2012; MORÉS et al., 2015).

O PRDC acomete suínos desde a fase de creche até a terminação, predominantemente na fase de crescimento e terminação, com quadro clínico caracterizado por tosse de severidade variada, dificuldade respiratória, espirro, febre, e perdas produtivas em ganho de peso e eficiência alimentar. Em geral, agentes como *M. hyopneumoniae*, vírus influenza A (FLUAV) e PCV2 atuam como fatores primários ou facilitadores de infecções secundárias, como as causadas pela *P. multocida* e *Haemophilus parasuis* (THACKER; THACKER; JANKE, 2001; YAZAWA et al., 2004; BOCHEV, 2007; MAROIS et al., 2008; KITIKOON et al., 2009; HANSEN et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; DEBLANC et al., 2012; THACKER & MINION, 2012).

Bochev (2007) destaca que os quadros podem se apresentar como etiologia única ou mista, sendo que nestes casos é comum atuar o *M. hyopneumoniae*, além de um vírus e mais

uma bactéria. O autor também cita que fatores como a entrada do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva do suíno (PRRSV) e a ocorrência da síndrome multissistêmica do definhamento suíno causado pelo PCV2 podem facilitar a ocorrência do PRDC. Além destes, o *Actinobacillus pleuropneumoniae* também pode atuar como agente primário.

2.2 INTERAÇÃO ENTRE PATÓGENOS NO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS

Os patógenos primários atuam como facilitadores dos agentes secundários. Devido ao seu potencial imunodepressor, atuam na dinâmica dos problemas respiratórios e favorecem infecções oportunistas em suínos. Patógenos virais como FLUAV, PCV2, PRRSV e bacterianos, sendo o principal, o *M. hyopneumoniae* são causa primária do PRDC. Estes agentes causam lesões no trato respiratório que favorece o estabelecimento das infecções secundárias, como nas infecções por FLUAV em que há destruição das células do epitélio respiratório especialmente brônquios e bronquíolos. Os agentes oportunistas incluem na sua maioria os de etiologia bacteriana como *Mycoplasma hyorhinis*, *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida*, *Salmonella cholerasuis* (THACKER; THACKER; JANKE, 2001; HARMS et al., 2002; KIM; CHUNG; CHAE, 2003; YAZAWA et al., 2004; BOCHEV, 2007; KITIKOON et al., 2009; FRAILE et al., 2010; HANSEN et al., 2010; DEBLANC et al., 2012; OPRIESSNIG & HALBUR 2012; THACKER & MINION, 2012; WILSON et al., 2012; RAJÃO et al., 2013; OLIVEIRA FILHO et al., 2015; PAIXÃO et al., 2016).

A interação entre patógenos e ocorrência de quadros do PRDC já foi relatada em diversos países, entretanto Bochev (2007) ressalta que dados precisos em uma escala global não são possíveis visto que as manifestações clínicas variam de acordo com a granja/propriedade. No Brasil, 78% dos casos de lesões

pulmonares estudadas por Morés et al. (2011), apresentavam envolvimento de dois ou mais patógenos. De acordo com Paladino et al. (2012), os agentes predominantes em lesões pulmonares de suínos de crescimento e terminação foram FLUAV, *M. hyopneumoniae* e *P. multocida*, em diferentes associações, o que foi observado recentemente também por Schmidt et al. (2015). Na Dinamarca, Hansen et al. (2010) observaram ampla variação de lesões microscópicas e infecções mistas em suínos na fase de terminação com lesões macroscópicas de consolidação. Os agentes detectados com maior frequência foram: PCV2, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *P. multocida*. Rajão et al. (2013) destacaram casos de infecção por FLUAV no Brasil e relataram 32 amostras com co-infecções de FLUAV com um ou mais patógenos.

Avaliando patógenos bacterianos envolvidos em lesões de pneumonia de suínos ao abate, Fablet et al. (2012) verificaram que em 69,3% dos suínos, as lesões estavam associadas com *M. hyopneumoniae*, *P. multocida*, *H. parasuis*, *Streptococcus suis* e *A. pleuropneumoniae*. Os autores também observaram que *M. hyopneumoniae*, *P. multocida* e *H. parasuis* foram associados a lesões mais extensas no parênquima pulmonar, e, lesões de consolidação com característica de regressão foram relacionadas com *M. hyopneumoniae*.

Experimentalmente, a interação entre patógenos foi comprovada por Thacker; Thacker; Janke (2001) que destacaram a importância do *M. hyopneumoniae* e do FLUAV em causar danos ao epitélio ciliado do trato respiratório e, consequentemente, abrindo portas para agentes secundários. Deblanc et al. (2012) através de inoculações com vírus influenza H1N1 e *M. hyopneumoniae* comprovaram também a interação entre estes dois agentes. Os autores notaram que a infecção pelo H1N1 é fator de risco para maior gravidade das lesões respiratórias quando associado ao *M. hyopneumoniae.* O efeito desta sinergia causa o agravamento (atingindo os lobos diafragmáticos) das lesões pulmonares com impacto na difusão

e persistência da infecção pelo FLUAV, mas não influencia a excreção viral por via nasal. O efeito do *M. hyopneumoniae* e do FLUAV em associação tem relação com sua patogenia, uma vez que ambos agem nas células epiteliais do trato respiratório e causam danos no mecanismo de defesa mucociliar, diminuindo assim, sua efetividade (THACKER; THACKER; JANKE, 2001; LÓPEZ, 2006; HANSEN et al., 2010). Schmidt et al. (2015) complementaram que em casos de campo, infecções mistas de FLUAV e *M. hyopneumoniae* tem sinais clínicos mais exacerbados. Efeito similar foi demonstrado por Loving et al. (2010) quando estudaram a interação entre FLUAV e *B. bronchiseptica*.

Esta sinergia não é relatada apenas com o FLUAV. Opriessnig et al. (2004) mostraram que infecções mistas de *M. hyopneumoniae* e PCV2 podem desencadear quadro respiratório grave. Os autores avaliaram a infecção única destes agentes e a infecção de PCV2 posterior ao *M. hyopneumoniae*. Em ambos os casos de infecção única, as lesões e sinais respiratórios foram brandos e características da patogenia de cada agente, porém, quando a infecção foi mista (*M. hyopneumoniae* + PCV2), o resultado foi um quadro de doença respiratória grave. Este agravamento no quadro clínico provavelmente está relacionado ao ambiente propício para replicação do PCV2, embora, em condições de campo nem sempre seja esta a sequência de infecção.

As lesões observadas na necropsia ou monitoria de abate de animais afetados pelo PRDC inclui consolidação pulmonar com distribuição crânio-ventral. Na maior parte dos casos, não é possível definir diagnóstico etiológico apenas pela visualização das lesões macro e microscópicas, uma vez que, há similaridade das entre os patógenos, devendo-se utilizar exames complementares (moleculares, imuno-histoquímicos) para definir a etiologia (YAZAWA et al., 2004; HANSEN et al., 2010; MORÉS et al., 2011; MORÉS et al., 2015). É comum identificar mais de um agente na mesma lesão (FABLET et al.,

2002; HARMS et al., 2002; HANSEN et al., 2010; MORÉS et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011; DEBLANC et al., 2012; OLIVEIRA FILHO et al., 2015; MORAES et al., 2015; MORÉS et al., 2015; SCHMIDT et al., 2015).

Lesões graves como pleurites, nódulos e abscessos podem estar associadas à *H. parasuis* (RAPP-GABRIELSON et al., 2006), *A. pleuropneumoniae* (FABLET et al., 2002; MAROIS et al., 2008) e *P. multocida* (KICH et al., 2007; OLIVEIRA FILHO et al., 2015). A presença de exsudato purulento sempre indica a presença de contaminação bacteriana secundária, ou seja, agentes oportunistas do PRDC (HANSEN et al., 2010; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; WATANABE et al., 2012; MORAES et al., 2015; OLIVEIRA FILHO et al., 2015; SCHMIDT et al., 2015).

Estudos de Watanabe et al. (2012) mostraram que depois de 2010 quando o vírus influenza pandêmico passou a circular no Brasil, um novo padrão de lesão histológica passou a ser mais frequente, a bronquiolite necrótica. Recentemente Schmidt et al. (2015) ressaltaram a importância da participação deste agente viral no PRDC no Brasil, identificando os subtipos H1N2 e A(H1N1)pdm09 em secreção nasal e pulmão de suínos de maternidade e terminação oriundos de rebanhos sem histórico de vacinação para FLUAV, porém, com surtos de doença respiratória e repetidos episódios de PRDC.

Independente da apresentação clínica, é comum observar o vírus associado a agentes co-infectantes, tanto virais como bacterianos. Dentre os mais comuns pode-se citar PRRSV, parvovírus suíno, *M. hyopneumoniae* e o FLUAV. A imunossupressão causada pela depleção linfóide e linfopenia é um importante evento para que as doenças associados ao PCV2 aconteçam, nestes casos, a doença é mais expressiva com resultados consistentes confirmados por reprodução experimental (PALLARES et al., 2002; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; KING; CHUNG; CHAE, 2008; GILLESPIE

et al., 2009; OPRIESSNIG & HALBUR 2012; SEGALÉS, 2012; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012).

Gillespie et al. (2009) demonstraram nos EUA que em mais de 98% dos animais diagnosticados com PCV2 havia co-infecções, sendo PRRSV (52%) e *M. hyopneumoniae* (36%) os mais frequentes. No Brasil, o *H. parasuis* passou a ter grande importância clínica evidenciada pela maior frequência diagnóstica após o aparecimento da circovirose (MORÉS et al., 2012).

Opriessnig & Halbur (2012) citam que PCV2 associado ao *M. hyopneumoniae* foi detectado em 15,5% dos casos de doença sistêmica e FLUAV associado ao PCV2 em 13%. Tanto Harms et al. (2002) como Pallares et al. (2002) evidenciaram que em condições de campo os vírus influenza e PCV2 atuam em sinergismo, podendo os dois vírus ser identificados em um mesmo suíno com PRDC. A infecção pelos mesmos agentes também é descrita por Opriessnig et al. (2004). Os autores observaram redução no desenvolvimento, lesões pulmonares graves e lesões em linfonodos com depleção linfóide além da detecção do antígeno viral nas lesões. De acordo com Kim; Chung; Chae (2003), o *M. hyopneumoniae* juntamente com o PCV2 tem papel primário nos quadros de PRDC. O *M. hyopneumoniae* favorece as lesões pulmonares e linfóides do PCV2 (OPRIESSNIG & HALBUR, 2012). Quando o PCV2 foi inoculado após o *M. hyopneumoniae* foi observado quadro respiratório mais grave (OPRIESSNIG et al., 2004), entretanto, quando os animais foram inoculados simultaneamente com PCV2 e *M. hyopneumoniae* não foi observado efeito sinérgico (SIBILA et al., 2012).

2.2.1 Influenza A

A influenza suína é uma zoonose de importância mundial caracterizada por uma infecção viral aguda do trato respiratório. O agente etiológico é o FLUAV, pertencente ao gênero *influenza*

virus A e a família *Orthomyxoviridae*. Estes são vírus envelopados, de genoma RNA segmentado, sentido negativo e protegidos por uma proteína viral chamada nucleoproteína. Os diferentes subtipos virais são classificados com base na antigenicidade das glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), que são potentes alvos da resposta imune do hospedeiro (BROWN, 2000; DUBEY; VENKATESH; KULKARNI, 2009; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; RAJÃO et al., 2014b; VINCENT; LAGER; ANDERSON; 2014).

Os FLUAVs infectam mamíferos e aves, e na epidemiologia da doença, o suíno tem papel importante por possuir distintos receptores de ácido siálico (α-2,6 e α-2,3) nas células epiteliais do trato respiratório. Esta característica permite ao suíno a infecção concomitante com vírus influenza de suínos, humanos e aviários. Se uma mesma célula for infectada com diferentes subtipos virais pode ocorrer troca de segmentos gênicos *"antigenic shift"*, e consequentemente o aparecimento de novos vírus para os quais os suínos podem não apresentar imunidade. Além disto, mutações pontuais no FLUAV podem ocorrer devido a erros na incorporação de nucleotídeos durante a replicação viral e são chamadas de "*antigenic drift"* (BROWN, 2000; OLSEN, 2002; VAN REETH et al., 2008; VINCENT et al., 2010; CIACCI-ZANELLA et al., 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; RAJÃO et al., 2014b; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014; YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014).

No Brasil, dados sorológicos e moleculares indicam a presença em suínos dos subtipos H1N1, H3N2 e H1N1pdm09 (BRENTANO et al., 2002; SCHAEFER; TREVISOL; PALUDO, 2008; CARON et al., 2010; CIACCI-ZANELLA et al., 2011; SCHAEFER et al., 2011; RAJÃO et al., 2013; CIACCI-ZANELLA et al., 2015) e recentemente, tanto em populações de suínos quanto de javalis, foi detectado o subtipo H1N2 (BIONDO et al., 2014; CIACCI-ZANELLA et al., 2015;

SCHAEFER et al., 2015). O vírus H1N1pdm09 foi identificado em suínos no Brasil por Schaefer et al. (2011) durante um surto de infecção respiratória aguda em suínos de idades variadas. Este surto coincidiu com a ocorrência da pandemia de influenza A (H1N1)pdm09 em humanos. Ciacci-Zanella et al. (2011) analisaram soros coletados de suínos no Brasil, antes e depois do ano da pandemia (2009), e confirmaram a presença de anticorpos contra o A(H1N1)pdm09 em suínos somente após 2009.

O vírus da influenza suína causa uma infecção auto-limitante e endêmica, caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade. A doença inicia de forma abrupta, com período de incubação curto, entre 24 e 48 h, curso rápido e recuperação dos animais em quatro a sete dias. No período inicial da doença, as secreções respiratórias possuem alta concentração de vírus, decaindo após sete dias da infecção (LANGE et al., 2009; LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; GAUGER et al., 2012; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014).

A transmissão do FLUAV ocorre por contato direto, aerossóis, tosse, espirro, fômites e pela introdução de animais portadores no rebanho (ROMAGOSA et al., 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; JANKE, 2014). A facilidade na disseminação aérea do vírus se dá pelo tempo de permanência das partículas suspensas no ar, que pode chegar a 20 dias, com pico entre sete e 11 dias (NEIRA et al., 2016). É uma doença de rebanho geralmente acometendo animais na fase de creche, uma vez que, os anticorpos maternos, em rebanhos vacinados, persistem até a sexta semana de vida. Os anticorpos de suínos infectados pelo FLUAV são detectados a partir dos sete dias pós-infecção, com pico de produção entre duas a três semanas e declínio por volta das oito a 10 semanas pós-infecção (DUBEY; VENKATESH; KULKARNI, 2009; VINCENT et al., 2010; ROMAGOSA et al., 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; JANKE, 2014).

Animais mais jovens normalmente apresentam infecção mais grave que animais adultos. A infecção é restrita ao trato respiratório e a replicação viral ocorre nas células epiteliais na cavidade nasal, tonsilas, traqueia, pulmões e linfonodos. A sintomatologia é semelhante ao descrito em humanos, com tosse não produtiva, febre, diminuição no consumo alimentar, descarga nasal, espirro, conjuntivite suave, depressão e leve desidratação. Em caso de infecções secundárias, a tosse passa a ser progressiva com aparecimento de dispneia acarretando na maioria dos casos, em mortalidade (BROWN, 2000; LÓPEZ, 2006; DUBEY; VENKATESH; KULKARNI, 2009; LANGE et al., 2009; LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; ROMAGOSA et al., 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; RAJÃO et al., 2014b; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014; YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014). Em inoculação experimental com H1N1, H1N2 e H3N2, Lyoo et al. (2014) não observaram diferença na apresentação de sinais clínicos entre os subtipos inoculados, e os animais apresentaram espirro, tosse e temperatura corporal acima de 40ºC em dois a quatro dias pós-inoculação.

Devido à infecção se dar pela via inalatória, as lesões macroscópicas caracterizam-se, na maioria dos casos, por consolidação pulmonar crânio-ventral de coloração avermelhada, nos lobos craniais, médios e acessório. Em casos de infecção aguda severa observa-se congestão e edema pulmonar (LÓPEZ, 2006; LANGE et al., 2009; LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; WATANABE et al., 2012; JANKE, 2014; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014). Lyoo et al. (2014) notaram diferença na gravidade das lesões entre os grupos inoculados com diferentes subtipos virais. Leitões inoculados com o subtipo H3N2 apresentaram maior escore de lesão pulmonar do que os inoculados com os subtipos H1N1 e H1N2 nos dias quatro, sete e 14 pós-inoculação. Na inoculação experimental de influenza A

(H1N1)pdm09, Vincent et al. (2010) observaram lesões atingindo até 22% de área pulmonar e, relataram um caso de doença clínica; por sua vez, Schaefer et al. (2011) descreveram, em casos de campo, lesões envolvendo até 30% do pulmão. Lange et al. (2009) relatam além das lesões pulmonares, hiperemia de cornetos nasais.

Na histopatologia a lesão é caracterizada por bronquite e bronquiolite necrosante, infiltrado linfocítico peribronquiolar leve, pneumonia broncointersticial, necrose multifocal e acúmulo de neutrófilos e células descamadas no lúmen, podendo levar a bronquiolite obliterante (LÓPEZ, 2006; LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; WATANABE et al., 2012; RAJÃO et al., 2013; LYOO et al., 2014; SCHMIDT et al., 2015). Janke (2014) constatou que em alguns casos é possível se observar hiperplasia de linfócitos ao redor de vias aéreas antes mesmo do epitélio ser danificado, e em complemento, estudos de Gauger et al. (2012) demonstraram que esta lesão foi observada associada à doença respiratória exacerbada associada à vacinação (VAERD).

Outras lesões incluem proliferação desorganizada do epitélio de revestimento em brônquios e bronquíolos em recuperação, em até 72 h pós-infecção e leve traqueíte crônica não específica (LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; JANKE, 2014). Bronquiolite obliterante é relatada em casos severos onde a exposição da lâmina própria induz a proliferação de fibroblastos que resulta na formação de pólipos bronquiais obliterando a via aérea (JANKE, 2014).

Nos alvéolos pode haver debris celulares necróticos, infiltrado inflamatório e espessamento da parede alveolar (VINCENT et al., 2010; LYOO et al., 2014; SCHMIDT et al., 2015). Diferenças na histopatologia são observadas de acordo com o subtipo infectante, Lyoo et al. (2014) observaram lesão histológica dois dias pós-inoculação intratraqueal com o subtipo H3N2, já com o subtipo H1N1, as lesões foram mais evidentes 14 dias pós-inoculação. A marcação do antígeno por imuno-

histoquímica (IHQ) se dá em células epiteliais necróticas descamadas de bronquíolos e restos necróticos no lúmen alveolar (VINCENT et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; RAJÃO et al., 2013). Watanabe et al. (2012) constataram marcação por IHQ em apenas 45% dos casos de pneumonia viral de campo, e, Rajão et al. (2013) ressaltam a marcação do antígeno em lesões de broncopneumonia neutrofílica sem necrose de epitélio de bronquíolos, lesão característica de FLUAV.

Para detecção do FLUAV pode-se utilizar métodos diretos de diagnóstico que detectam o antígeno. Estes incluem isolamento viral em ovos embrionados de galinhas SPF e/ou cultivo celular (padrão ouro), testes moleculares como reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) além da IHQ. O diagnóstico também pode se dar mediante detecção de anticorpos (métodos indiretos), tais como: testes sorológicos – técnica de ELISA (teste imunoenzimático), inibição da hemaglutinação (HI), imunofluorescência indireta e soroneutralização (VINCENT et al., 1997; HOFFMANN et al., 2001; CIACCI-ZANELLA et al., 2010; LORUSSO et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012; CULHANE & DETMER, 2014; VINCENT; LAGER; ANDERSON, 2014; ZHANG & HARMON, 2014).

A análise histopatológica permite visualizar as lesões características e se associada ao teste de IHQ positivo, permite a detecção do antígeno viral na lesão (LÓPEZ, 2006; LOVING et al., 2010; VINCENT et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011; WATANABE et al., 2012; RAJÃO et al., 2013). O diagnóstico patológico deve incluir tecidos como cornetos nasais, tonsilas, traqueia e pulmão. Estes materiais podem ser utilizados para avaliação histológica e identificação de alterações, bem como para confirmar o diagnóstico quando interpretado em conjunto com resultados da sorologia, moleculares e IHQ (LANGE et al., 2009; SCHAEFER et al., 2011; CULHANE & DETMER,

2014). Os dados clínicos e epidemiológicos auxiliam, mas não são definitivos (SCHAEFER et al., 2011; CULHANE & DETMER, 2014).

Os testes de HI e ELISA são testes de referência para suínos, e permitem a detecção de anticorpos (CIACCI-ZANELLA et al., 2010; CULHANE & DETMER, 2014; PEDERSEN, 2014). O teste de HI determina o estado imunitário do rebanho (GALLIHER-BECKLEY et al., 2015) com base na inibição da hemaglutinação de hemácias e tem a vantagem do uso de anticorpos subtipo específicos (PEDERSEN, 2014). Para técnicas moleculares, quando os resultados forem negativos, deve-se na interpretação dos mesmos, levar em consideração o curto período de excreção viral (LANGE et al., 2009), podendo estar relacionado ao tempo de infecção. Lyoo et al. (2014) em inoculação experimental com subtipos virais H1N1, H1N2 e H3N2, identificaram o RNA do FLUAV no pulmão de suínos por até 14 dias para subtipo H1N1, e para os subtipos H1N2 e H3N2 em até sete dias pós infecção. Os autores ressaltam que a detecção máxima se deu aos quatro dias pós-infecção. Complementando tais afirmações, Culhane & Detmer (2014) citam que mesmo que o FLUAV replique no trato respiratório, o vírus somente é detectado no período que coincide com a presença dos sinais clínicos. Podem ser colhidas amostras de secreção nasal, fluído oral e lavado bronco-alveolar, sendo esta última colhida no período pós-mortal. A detecção do FLUAV em secreção nasal e fluído oral é descrita por De Corte et al. (2015). Os autores relatam que a secreção nasal apresenta maiores chances de detecção na fase aguda, até cinco dias pós-infecção e se deve a replicação do vírus no epitélio da cavidade nasal, enquanto a detecção por fluído oral pode ocorrer por um período maior e com maior quantidade de vírus. A maior detecção por fluído oral pode estar relacionada à detecção do antígeno nas secreções (células inflamatórias e descamadas do trato respiratório inferior), todavia para isolamento viral

(partículas ativas) o fluído oral não é tão eficiente quanto à secreção nasal.

2.2.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

O *M. hyopneumoniae* é um dos mais importantes agentes causadores de doenças em suínos, seja pela sua alta prevalência nos rebanhos ou devido aos prejuízos causados com as pneumonias, como parte do PRDC. Esta bactéria causa uma broncopneumonia, por vezes chamada de pneumonia enzoótica (CIPRIAN et al., 1988; REDONDO et al., 2009; THACKER & MINION, 2012). O agente é transmitido por contato com animais contaminados ou pelo ar. Os sinais característicos da enfermidade incluem tosse seca, não produtiva e perdas em desempenho, especialmente em animais na fase de crescimento e terminação. A morbidade é alta, porém, são raros os casos de mortalidade (CIPRIAN et al., 1988; THACKER & MINION, 2012). Quadros clínicos na fase de creche são raros, visto que o período de incubação da bactéria é relativamente longo.

Um ponto fundamental pelo qual o *M. hyopneumoniae* é um dos agentes mais importantes do PRDC se deve a sua patogenia. A bactéria é capaz de modular a resposta do organismo e com isto, favorecer a infecção com patógenos oportunistas. O agente se liga aos cílios do epitélio respiratório e provoca ciliostase além de estimular a proliferação do tecido linfoide. Como o agente se adere aos cílios, há uma dificuldade na ação do sistema imune, dificultando qualquer resposta (BOCHEV, 2007; REDONDO et al., 2009; THACKER & MINION, 2012; SIMIONATTO et al., 2013). O grau de acometimento do pulmão e sinais clínicos podem ser brandos ou graves, dependendo dos agentes oportunistas, condições ambientais e manejo (HANSEN et al., 2010).

Na macroscopia, as lesões são características de broncopneumonia envolvendo a região crânio-ventral dos lobos apicais, cardíacos, diafragmáticos e intermediário. As áreas

afetadas são bem delimitadas do tecido normal, sua coloração é vermelho-escuro a acinzentado e consistência firme recebendo a denominação de consolidação (CIPRIAN et al., 1988; THACKER & MINION, 2012). Na histopatologia as lesões são observadas em brônquios e bronquíolos. Exsudação inflamatória na luz nas vias aéreas é notada no quadro mais agudo, e, na lâmina própria é comum infiltrado de células mononucleares. Um achado muito frequente é a hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), em que ocorre aumento deste tecido devido à divisão celular, podendo ocorrer também hipertrofia de pneumócitos (CIPRIAN et al., 1988; CALSAMIGLIA; COLLINS; PIJOAN, 2000; BOCHEV, 2007; REDONDO et al., 2009; SEO et al., 2014).

Para diagnóstico, as técnicas mais efetivas são as moleculares e IHQ associadas à observação das lesões, além do quadro clínico sugestivo. Como o agente tem a particularidade de não se desenvolver facilmente em meios de cultivo, o isolamento não é uma técnica usualmente utilizada (CALSAMIGLIA; COLLINS; PIJOAN, 2000; PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009; THACKER & MINION, 2012; SIMIONATTO et al., 2013). Calsamiglia; Collins; Pijoan, (2000) correlacionaram a lesão histológica sugestiva de *M. hyopneumoniae* com a detecção do agente pela técnica de PCR e verificaram boa correlação, exceto em uma infecção muito precoce ou tardia. Pieters et al. (2009) detectaram o agente em animais inoculados por até 214 dias pós infecção.

A medida terapêutica indicada é o uso de antimicrobianos, seja em pulsos estratégicos ou, como medida de tratamento no caso de um surto. Para profilaxia, as alternativas mais efetivas incluem uma ação estratégica com técnicas de manejo, especialmente aquelas relacionadas à qualidade do ar e instalações, e, uso de vacinação (THACKER & MINION, 2012). As vacinas inativadas tem uso rotineiro e seus benefícios são bem conhecidos. Mesmo não impedindo a infecção, melhorias no desempenho e menor ocorrência de

sinais clínicos são relatados além de uma proteção parcial ao desenvolvimento de lesões (THACKER & MINION, 2012; SIMIONATTO et al., 2013).

2.2.3 Circovirus Suíno Tipo 2

O gênero Circovirus inclui pequenos vírus, não envelopados, com genoma DNA circular, de fita simples pertencentes à família *Circoviridae*. Análises filogenéticas do vírus demonstram a existência de quatro diferentes tipos de PCV2, o PCV2a, PCV2b, PCV2c (detectado apenas na Dinamarca e recentemente em suídeos selvagens no Brasil) e PCV2d. Recentemente foi descrito o PCV2b mutante, realocado para o grupo do PCV2d. Este subtipo possui uma alteração na ORF2, um aminoácido extra que codifica a proteína do capsídeo (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS et al., 2008; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012; VIDIGAL et al., 2012). No Brasil, o PCV2 foi inicialmente detectado em 2000 em Santa Catarina, onde a doença foi caracterizada por definhamento e lesões severas no tecido linfoide (CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2003). Até a introdução de vacinas comerciais em 2008, o controle da circovirose em rebanhos brasileiros era baseado na correção de fatores de risco para a infecção. Dentre os diferentes genótipos já identificados, o PCV2a foi inicialmente o mais prevalente em suínos afetados pela circovirose até 2003, sendo as vacinas comerciais desenvolvidas a partir deste subtipo. Entretanto, o PCV2b emergiu globalmente e se tornou o genótipo mais prevalente em suínos associado a surtos mais severos de doença sistêmica (SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012; VIDIGAL et al., 2012).

Este agente é emergente e de grande importância econômica para suínos (FACHINGER et al., 2008; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). O PCV2 tem importância epidemiológica e clínica causando diferentes síndromes que de

acordo com Segalés (2012) incluem: 1) infecção subclínica; 2) doença sistêmica (enfermidade complexa com diferentes sinais clínicos, sendo o emagrecimento progressivo o mais frequente); 3) doença pulmonar (HARMS et al., 2002; KIM; CHUNG; CHAE, 2003; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; HANSEN et al., 2010); 4) doença entérica (OPRIESSNIG & HALBUR 2012); 5) doença reprodutiva; e, 6) síndrome da dermatite e nefropatia (SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). Indiferente das apresentações clínicas pode ser citado como doenças associadas ao PCV2 (PCVAD) (OPRIESSNIG & HALBUR 2012; SEGALÉS, 2012).

Diversos sinais clínicos são observados nos leitões de rebanhos infectados, e, o sinal mais frequente inclui emagrecimento rápido e progressivo. Em casos de PRDC ocorrem sinais relacionados à pneumonia. Outra forma de apresentação do PCV2 é causando uma doença subclínica, onde apenas se observa desempenho insuficiente associado a maior ocorrência de diarreia e pneumonia (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; HANSEN et al., 2010; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012; MORÉS et al., 2012; SEGALÉS, 2012).

As lesões macroscópicas indicativas do envolvimento deste vírus incluem aumento de linfonodos (inguinais, mesentéricos e mediastínicos), atrofia do timo e pulmão não colabado, e, às vezes com pequenas áreas disseminadas de consolidação (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). A descrição de caso clínico relacionado a edema pulmonar agudo é reportada por Cino-ozuna et al. (2011), porém não é observação rotineira na clínica. As alterações histopatológicas ocorrem nos tecidos linfoides com perda da arquitetura do tecido, depleção linfóide variada, necrose de células linfoides, especialmente nos centros foliculares, às vezes com infiltração de histiócitos, formação de granulomas e presença de células multinucleadas. No pulmão há espessamento da parede alveolar devido à proliferação celular (pneumócitos tipo II) e infiltração

de linfócitos e histiócitos que também aparecem ao redor de vasos e vias aéreas (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012). Quando no PRDC, o PCV2 causa pneumonia broncointersticial com fibrose peribronquial e peribronquiolar. Os septos alveolares se apresentam espessos com infiltrado de linfócitos e histiócitos (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; HARMS et al., 2002; KING; CHUNG; CHAE, 2008; SEGALÉS, 2012).

Devido à ampla disseminação do patógeno e a possibilidade de ser identificado em animais sadios, são citados três aspectos para confirmação dos casos: 1) sinais clínicos compatíveis incluindo: emagrecimento progressivo, sinais respiratórios e/ou diarreia; 2) lesões macroscópicas e microscópicas; 3) detecção de antígenos ou de ácidos nucléicos do PCV2 associados com as lesões (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012).

O isolamento viral pode ser realizado em células, porém deve ser associado à imunofluorescência ou imunoperoxidase, pois o agente não produz efeito citopático. A técnica de PCR é utilizada para detectar DNA de PCV2 a partir de diferentes amostras, como sangue total, soro, secreções nasais, fezes, sêmen e diferentes tecidos. A IHQ permite a identificação dos antígenos nos tecidos associado às lesões. Para estas técnicas, os tecidos linfoides são os de preferência devido à alta concentração de vírus, porém pode ser detectado também em rim, trato respiratório e outros (KIM & CHAE, 2001; HARMS et al., 2002; SHIBATA et al., 2003; OPRIESSNIG et al., 2004; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012).

Dentre as medidas profiláticas, as boas práticas de manejo auxiliam consideravelmente na diminuição da doença clínica. Para prevenção, além do uso de vacinas deve-se focar na diminuição das co-infecções, que em geral agravam os quadros, como mencionado por Opriessnig e Halbur (2012) para quadros clínicos com envolvimento do PCV2 e *M. hyopneumoniae*. O efeito da vacinação é benéfico na redução ou eliminação do

vírus, menor ocorrência de doença subclínica e diminuição das perdas econômicas, porém é necessário considerar a ocorrência das PCVAD (SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). Fachinger et al. (2008) demonstram que a vacinação dos animais reduz significativamente a duração da viremia e, consequentemente, a carga viral.

2.4 PREVENÇÃO DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS DOS SUÍNOS – USO DE VACINAS

Dentre as possibilidades para profilaxia das doenças respiratórias, o uso de vacinação tem sido uma alternativa frequente nos rebanhos de suínos. Embora não impeçam a infecção (SIBILA et al., 2007), estas vacinas atuam diminuindo os efeitos negativos dos agentes primários e secundários. O controle da infecção pelo FLUAV em suínos é crítico e fundamental, pois epidemiologicamente existem dificuldades na implantação de um protocolo efetivo devido às mutações do agente ocorrerem com frequência. Se o programa de controle for efetivo permite uma diminuição da disseminação do vírus bem como a redução de adaptação entre espécies, contribuindo com a minimização dos riscos dos animais serem fonte de infecção para uma pandemia (THACKER & JANKE, 2008; ROMAGOSA et al., 2011; RAJÃO et al., 2013; GALLIHER-BECKLEY et al., 2015; NEIRA et al., 2016).

As vacinas mais utilizadas são as inativadas ou autógenas comerciais (ROMAGOSA et al., 2011; RAJÃO et al., 2013; GALLIHER-BECKLEY et al., 2015) e tem o uso rotineiro nos Estados Unidos (RAJÃO et al., 2014b). No Brasil, há uma vacina comercial para o subtipo A(H1N1)pdm09 com recomendação para uso em fêmeas gestantes, marrãs e leitões com três ou mais semanas de vida. As vacinas autógenas não são liberadas para uso. Além de fatores individuais e de manejo que possam interferir no sucesso de protocolos de vacinação, especialmente para FLUAV, a diversidade antigênica contínua

dos vírus - mutações virais (*shift* e *drift*) e o efeito dos anticorpos maternos, que persistem até a sexta semana de vida tem que ser levado em consideração. Anticorpos maternos adquiridos através do colostro podem reduzir a doença clínica, entretanto são menos efetivos no bloqueio da excreção viral (KITIKOON et al., 2006; THACKER & JANKE, 2008; VINCENT et al., 2010; VAN REETH et al., 2012; VINCENT et al., 2012; RAJÃO et al., 2013; JANKE, 2014; RAJÃO et al., 2014a; RAJÃO et al., 2014b). Rajão et al. (2013) ressaltam que como as vacinas ainda não são amplamente utilizadas, manejo e medidas específicas de prevenção são importantes na redução dos sinais clínicos bem como disseminação viral. Ainda, antes de se implantar um protocolo de vacinação para FLUAV, deve-se ter conhecimento de quais são os subtipos que circulam nos rebanhos e associar a circulação dos vírus com doença clínica.

As vacinas inativadas estimulam a produção de IgG desde que acrescidas de um adjuvante. As IgGs protegem da doença clínica, tendo uma limitação de resposta imune na mucosa. Os anticorpos produzidos contra a HA parecem ser mais protetores, porém, a proteção contra a infecção não é completa, mas a multiplicação do vírus e excreção viral reduzem (THACKER & JANKE, 2008; ROMAGOSA et al., 2011; RAJÃO et al., 2014b). Estas vacinas inativadas apresentam a desvantagem de induzir a VAERD, fenômeno que ocorre quando suínos são desafiados com subtipos heterólogos àqueles que foram imunizados, ocasionando uma incompatibilidade entre subtipos. A VAERD corresponde a uma pneumonia broncointersticial severa com bronquiolite necrótica e hiperplasia de BALT (GAUGER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; VINCENT et al., 2012; RAJÃO et al., 2014a; GALLIHER-BECKLEY et al., 2015). Gauger et al. (2011) descreveram a ocorrência de VAERD em suínos imunizados com vacina inativada para A/H1N1pdm09 e desafiados com o H1N2 heterólogo. Os autores observaram maior excreção viral aos dois dias pós-infecção e lesões pulmonares mais extensas no

grupo vacinado e desafiado, quando comparado ao grupo desafiado, mas não vacinado.

Ainda investigando a ocorrência de VAERD, Gauger et al. (2012) avaliaram suínos imunizados com vacina inativada para o subtipo H1N2 e desafiados com A/H1N1pdm09, e comprovaram que, a vacina não impede a infecção. Também, observaram maior intensidade de sinais clínicos no grupo vacinado e desafiado quando comparado ao grupo não vacinado e desafiado. Além disto, os suínos desafiados com A/H1N1pdm09 demonstraram lesões de consolidação crânio-ventral, típicas de infecção por FLUAV predominantes nos lobos craniais e médios, já no grupo vacinado e desafiado as lesões estendiam-se até a porção cranial do lobo caudal. A maior porcentagem de lesão de consolidação foi observada nos animais vacinados (20%) quando comparados ao controle (7%). Ambos os grupos apresentaram marcação por IHQ, entretanto, as lesões histológicas no grupo vacinado eram mais extensas.

Vacinas vivas modificadas são estudadas como possíveis alternativas ao uso de vacinas inativadas. A vantagem é uma maior estimulação de imunidade mediada por células para a nucleoproteína conservada, conferindo imunidade homóloga efetiva e heteróloga parcial (THACKER & JANKE, 2008; VINCENT et al., 2012). Estas vacinas podem ser risco potencial para animais imunodeprimidos e, pode ocorrer a reversão do vírus utilizado (GALLIHER-BECKLEY et al., 2015). As vacinas DNA, que estimulam imunidade de longa duração e tem a vantagem da produção de proteínas virais normais sem os riscos associados com a utilização de vírus vivo, são uma alternativa as inativadas. Estas proporcionam imunidade heterossubtípicas e apresentam pouca interferência dos anticorpos maternos, conferindo boa imunidade humoral, celular e de mucosa (THACKER & JANKE, 2008; RAJÃO, 2014b). Vacinas de subunidades de proteína recombinante têm sido propostas como alternativa a reduzir o tempo de produção da

vacina, o que seria uma vantagem interessante, pois o vírus está em constante mutação (RAJÃO et al., 2014a).

Para os outros agentes do PRDC, a vacinação é uma forma de profilaxia amplamente utilizada especialmente para *M. hyopneumoniae* e PCV2. As vacinas mais utilizadas em rebanhos brasileiros, por ordem de frequência são para PCV2, *M. hyopneumoniae* e *A. pleuropneumoniae* (MORÉS et al., 2015). Animais vacinados para PCV2 tem um acréscimo no ganho de peso e conversão alimentar além de ganhos na carcaça. Em animais co-infectados com agentes oportunistas, reduz a ocorrência clínica da doença, pois previne a viremia. O foco da prevenção não pode se basear apenas na vacinação, é preciso trabalhar na redução da carga contaminante em geral na granja, ou seja, reduzir os agentes oportunistas (PALLARES et al., 2002; BOCHEV, 2008; OPRIESSNIG & HALBUR 2012; WILSON et al., 2012; SEO et al., 2014; RAITH et al., 2015). Para *M. hyopneumoniae*, Sibila et al. (2007) observaram menor ocorrência de lesões em animais vacinados quando comparado aos controles, não vacinados.

Testando o efeito da vacinação para *M. hyopneumoniae* e PCV2 em suínos desafiados, Seo et al., (2014) observaram que suínos vacinados apenas para *M. hyopneumoniae* e desafiados com os dois agentes apresentaram maior quantidade de cópias virais no soro quando comparados aqueles que receberam vacina contra os dois agentes. Desta forma, a vacinação apenas para *M. hyopneumoniae* não reduz viremia e nem lesões associadas ao PCV2. Ainda, os autores mencionam que a infecção com os dois agentes acarreta em lesões mais graves das observadas quando apenas o PCV2 é inoculado. Isto não é observado quando os animais são desafiados apenas com o *M. hyopneumoniae*, neste caso se observou lesões de intensidade muito parecida daquelas observadas na inoculação de PCV2 e *M. hyopneumoniae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo faz parte de um projeto de pesquisa da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC, intitulado "Desenvolvimento e aprimoramento de métodos e insumos para o diagnóstico, prevenção e controle de doenças virais de suínos: foco no agronegócio brasileiro, na saúde humana e animal". Este projeto de pesquisa é dividido em planos de ação, sendo o "Desenvolvimento de candidato vacinal para o vírus de influenza em suínos" o plano de ação correspondente ao projeto apresentado na sequência. Além do objetivo do desenvolvimento da vacina, o trabalho ainda estuda outros agentes associados ao PRDC com o título ETIOPATOLOGIA DO COMPLEXO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS VACINADOS PARA VÍRUS INFLUENZA A (A(H1N1)pdm09). Este projeto é uma parceria da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) e do Laboratório de Patologia Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - LAPA, UDESC (Lages-SC), aprovado pelo CNPq, Chamada Universal, edital MCTI – 14/2013.

A produção da vacina, teste de campo, colheitas de material, avaliação patológica (necropsia e abate), análises sorológicas e moleculares foram realizadas no complexo de laboratórios de Sanidade e Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, e a avaliação histopatológica e IHQ foi realizada no LAPA, UDESC. Ressalta-se que todos os procedimentos aplicados no presente trabalho foram aprovados pelo cômite de ética CEUA – Embrapa Suínos e Aves, protocolo número 004/2011.

3.1 PREPARAÇÃO DA VACINA

A vacina foi produzida a partir de um isolado do vírus influenza A(H1N1)pdm09 (A/swine/Brazil/107/2010) de 2010 (número de acesso GenBank KF683611-KF683618), isolado de

suínos com sinais clínicos respiratórios alojados na fase de creche no estado de Santa Catarina (SCHAEFER et al., 2011).

Para a produção de grande quantidade viral, o vírus foi inoculado em ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) por quatro dias e o fluido alantoide foi coletado. Em seguida, o vírus foi replicado em células MDCK (Madin-Darby canine kidney) e a titulação TCID50 calculada pelo método descrito por Reed & Muench (1938) foi $10^{4.38}$ por mL. A inativação do vírus foi realizada com 2-bromoetilamina bromidrato (BEI) (Sigma-Aldrich) 0,1M seguido de neutralização com tiossulfato de sódio 1M. A efetividade da inativação foi testada através da inoculação do vírus inativado em ovos embrionados SPF seguida da análise do fluído alantóide por imunocitoquímica para diagnóstico de FLUAV em cultivo de células MDCK. Além disto, foi realizado o teste de esterilidade em meios específicos para crescimento de bactérias e fungos.

Foram utilizados dois adjuvantes, o Emulsigen® (Emulsigen D, (MVP Laboratories, Inc.®)) a base de óleo-em-água e o hidróxido de alumínio. A proporção de solução de vírus:adjuvante utilizada foi de 4:1. Após a produção e teste de esterilidade, a vacina foi envasada e conservada a 4ºC até o momento da aplicação.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – TESTE DA VACINA A CAMPO

As atividades na granja experimental iniciaram-se no dia 09/01/2014 com o desmame do primeiro lote de animais (lote 1) e encerraram-se no dia 28/06/2014 quando os animais do último lote (lote 3) foram abatidos. No total foram avaliados 420 animais divididos em três lotes, com intervalos de 21 e 15 dias.

Previamente a execução do teste no campo, foram realizados dois diferentes experimentos pilotos. Um deles avaliou a efetividade e inocuidade da vacina em animais SPF, e outro avaliou sorologicamente, a duração da imunidade materna

a fim de definir o momento ideal da vacinação, onde foi possível observar a diminuição dos anticorpos maternos a partir dos 28 dias de vida.

Os 420 suínos foram acompanhados desde o desmame até o abate na granja SPS (Sistema de Produção de Suínos) da Embrapa Suínos e Aves. Estes suínos foram divididos em três lotes, compreendendo 140, 112 e 168 leitões cada. Os animais de cada lote foram separados em um grupo controle e três grupos tratamento de acordo com a vacina e protocolos utilizados. Estes suínos eram filhos de 54 fêmeas não vacinadas para o vírus influenza A. Ao longo do período experimental que compreendeu as fases de creche, crescimento e terminação, foram realizadas colheitas de material e análises em diferentes momentos conforme demonstrado na figura 1.

Os animais foram vacinados com uma dose de 1,5 mL da vacina inativada monovalente para o vírus influenza A(H1N1)pdm09, pela via intramuscular no pescoço. O tipo de adjuvante utilizado e o número de doses variou entre os grupos. A primeira dose foi aplicada aos 35 dias de idade (5ª semana de vida), 14 dias após o desmame, e um reforço (2ª dose), foi aplicado 21 dias após a primeira dose, que correspondeu aos 55 dias de idade (8ª semana de vida).

Os grupos/tratamento incluíram:

G1: Grupo controle - utilizando PBS (Solução Salina Fosfatada Tamponada) - 2 doses – 35 e 55 dias de idade;

G2: Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - 2 doses – 35 e 55 dias de idade;

G3: Vacinação A(H1N1)pdm09 + Hidróxido de alumínio - 2 doses – 35 e 55 dias de idade;

G4: Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - Dose única aos 35 dias de idade.

No dia do desmame, antes da vacinação, correspondendo ao dia zero (D0) do experimento, foram colhidas amostras de

sangue e secreção nasal dos leitões. A metodologia de colheita de amostras de sangue seguiu o descrito por Schaefer et al. (2013). As fêmeas também foram amostradas no momento do desmame, através da colheita de secreção nasal e sangue.

No desmame os animais foram pesados individualmente e agrupados em baias conforme idade, peso, sexo e filiação – pai (genética), nos diferentes tratamentos. Os animais foram casualizados aleatoriamente e bloqueados em grupos utilizando o programa estatístico SAS (2002-2012). A partir deste procedimento foi possível garantir que todos os tratamentos receberam baias de animais leves, médios e pesados; machos e fêmeas. Ainda, os grupos foram dispostos nas baias das salas de creche de forma aleatória, por sorteio. Ao longo do experimento não houve mistura de animais, sendo o grupo de animais por baia determinado no desmame e permanecendo desta forma até o final da fase de terminação.

Na fase de creche a instalação dispunha de sete salas com 10 baias suspensas de 1,90 m^2, totalmente vazadas e na fase de terminação, três salas com 20 baias (7,50 m^2 cada) (Figura 2). As baias das salas de terminação eram compostas por ⅓ de piso ripado e as divisórias entre as baias eram vazadas. O lote 2, em função de apresentar um menor número de animais, não ocupou todas as baias da sala, ficando quatro baias livres, que mais tarde foram ocupadas pelos animais do lote 3.

Nas duas instalações os comedouros eram do tipo semi-automático e os bebedouros na creche eram do tipo ecológico (concha) e no crescimento e terminação eram do tipo niple (chupeta), com regulagem de altura. Em ambas as instalações havia um comedouro e um bebedouro por baia.

As salas eram bem ventiladas, sendo que, na fase de creche havia quatro janelas e uma porta central seguida de corredor e no crescimento-terminação, as baias eram dispostas com dois corredores centrais e com cortinas para controle de temperatura (Figura 2).

Figura 1 Delineamento experimental - Atividades desenvolvidas e data de colheita de amostras nas fases de creche, crescimento e terminação.

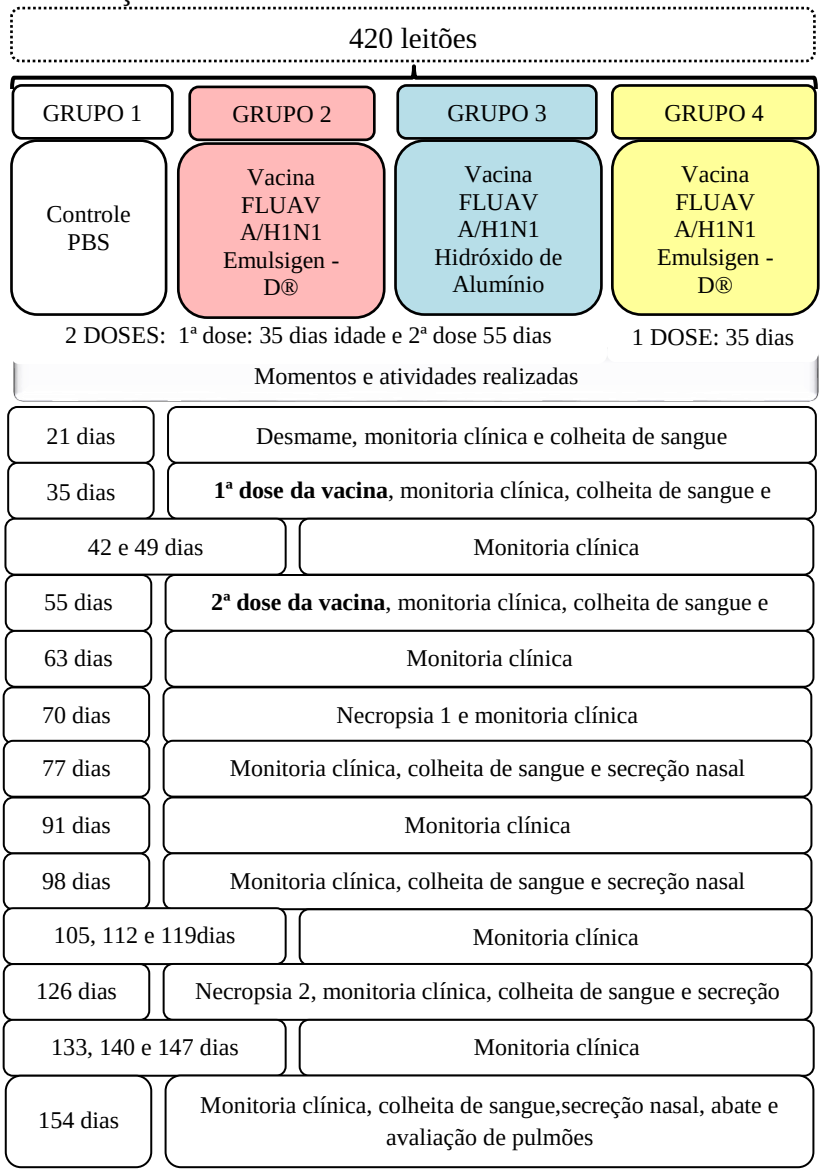
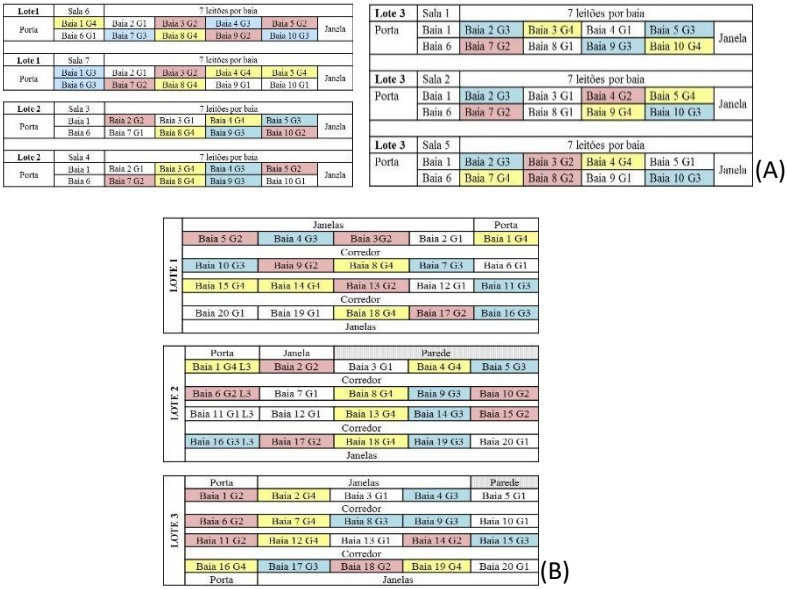


Figura 2 Diagrama esquemático da distribuição das baias e grupos/tratamento nas salas de creche (A) e crescimento-terminação (B) de acordo com o lote.



G1: Grupo controle; **G2:** Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - 2 doses; **G3:** Vacinação A(H1N1)pdm09 + Hidróxido alumínio - 2 doses; **G4:** Vacinação A(H1N1)pdm09 + Emulsigen - D® - Dose única.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

3.2.1 Manejos de ambiência e sanitários

Não houve interferência nos manejos rotineiros da granja e todas as atividades foram desempenhadas normalmente, como por exemplo, manejos de limpeza diária, arraçoamento e controle de ambiência. A granja é uma GRSC (Granja de Reprodutores Suídeos Certificada) e opera com sistema de ciclo completo possuindo 170 fêmeas produtivas. A unidade trabalha com sistema *all in – all out*, sendo que após a saída dos animais, em cada lote, as salas passavam pelo processo de limpeza e

desinfecção e, posteriormente, vazio sanitário de no mínimo sete dias.

As instalações de creche possuíam janelas e as salas de terminação, cortinas, sendo a ventilação ou a abertura das mesmas controladas de acordo com a temperatura ambiental. O monitoramento diário de temperatura interna nas instalações aconteceu apenas na fase de crescimento e terminação. Diariamente era verificada a temperatura máxima e mínima, às 09:00h e às 15:00h. A temperatura foi aferida em termômetro analógico para máxima e mínima, localizado suspenso no centro da sala. Sanitariamente a granja respeita todas as normas de biosseguridade exigidas por uma GRSC e utiliza como protocolo profilático a aplicação de vacinas para reprodutores e leitões (protocolo particular da granja seguindo as recomendações do fabricante). As matrizes e machos reprodutores eram vacinados para rinite atrófica, colibacilose e tríplice reprodutiva que inclui parvovirus, erisipela e leptospirose. Os leitões eram vacinados para PCV2 e *M. hyopneumoniae* ao desmame (21 dias). O Brasil é livre de PRRS e a granja está localizada no estado de Santa Catarina, livre da Doença de Aujeszky e Febre Aftosa sem vacinação, e livre de Peste Suína Clássica. Rotineiramente não são utilizados medicamentos incluídos na racão ou via água, sendo que os animais do experimento não receberam medicação antimicrobiana durante as fases. Na rotina da granja a medicação acontece apenas quando há algum caso clínico em que seja necessária a intervenção, neste caso, os animais são medicados preferencialmente pela via parenteral (IM) e individualmente.

3.2.2 Manejo nutricional

Os animais receberam ração farelada de acordo com programa nutricional estabelecido pela granja, seguindo as exigências nutricionais mínimas para cada fase (ROSTAGNO, et al., 2005). Foram utilizadas quatro rações na fase de creche - Pré 1, Pré 2, Inicial 1 e Inicial 2, sendo que, na primeira semana

de creche (ração Pré 1) a ração era fornecida na forma úmida. Na fase de terminação, três diferentes rações foram utilizadas, sendo Crescimento 1, Crescimento 2 e Terminação 1. A ração antes de ser fornecida era pesada e os dados anotados por baia, bem como, as sobras, para que fosse possível a realização do cálculo de conversão alimentar e consumo.

3.2.3 Pesagens

No período experimental foram realizadas pesagens, individuais ao nascimento, desmame, saída de creche e abate. Ainda foram realizadas pesagens a cada troca de ração, nas datas de necropsia e em caso de mortalidade de animais, a fim de calcular consumo de ração e conversão alimentar por baia/tratamento.

3.2.4 Monitoria na granja e colheita de amostras biológicas

3.2.4.1 Monitorias clínicas

No período de creche e crescimento-terminação, os animais foram monitorados semanalmente quanto à ocorrência de tosse e espirro. A contagem de tosse e espirro foi realizada segundo descrito por Soncini & Madureira Junior (1998). A contagem foi realizada por baia, sendo três contagens consecutivas, com duração de dois minutos cada. Inicialmente, os animais eram movimentados por dois minutos através de estímulos sonoros, aguardava-se um minuto em descanso e procedia-se a contagem de tosses e espirros por dois minutos, repetindo a atividade por mais duas vezes, totalizando três contagens. Outros sinais clínicos observados incluíam dispneia, diarreia, entre outros.

3.2.4.2 Colheita de sangue

Para análise sorológica os suínos foram amostrados em sete diferentes momentos através da colheita de sangue, respeitando um intervalo mínimo de 21 dias para estabelecer a curva de soroconversão. A colheita e processamento de sangue foi realizada de acordo com o citado por Schaefer et al. (2013). Ainda, foram monitoradas as 54 fêmeas, mães dos leitões. Nestas, a colheita de sangue aconteceu no dia do desmame.

3.2.4.3 Colheita de secreção nasal

Foram realizadas seis colheitas de secreção nasal utilizando suabes sintéticos (rayon) para pesquisa do FLUAV por RT-qPCR (ZHANG & HARMON, 2014). As colheitas foram realizadas nas mesmas datas em que foi realizada a colheita de sangue, exceto ao desmame. Após a colheita da secreção nasal, os suabes foram acondicionados refrigerados em meio de transporte viral suplementado com antibióticos e albumina sérica bovina e posteriormente processados em laboratório e aliquotados em microtubos e conservados a -80ºC seguindo o descrito por Schaefer et al. (2013).

3.2.4.4 Colheita de tecidos

Para estudo de lesões pulmonares dos leitões dos grupos tratamento e controle foram realizadas necropsias e monitorias de abate. Dos animais testados, 120 foram eutanasiados e necropsiados, correspondendo a 30 animais por grupo tratamento, sendo quinze leitões avaliados na “NECROPSIA 1” e quinze leitões na “NECROPSIA 2”.

A “NECROPSIA 1” refletia a situação de creche e primeira semana de alojamento no crescimento e a “NECROPSIA 2” refletia a fase de crescimento. Todos os animais foram eutanasiados de forma humanitária (MORÉS et

al., 2014). Em cada uma das necropsias foi eutanasiado um leitão por baia. A seleção do suíno para avaliação pós-mortal foi realizada através do peso médio dos animais da baia. Os demais animais foram abatidos com 155 dias de idade com avaliação dos pulmões e colheita de amostras independente da presença de lesões.

A definição da data da "NECROPSIA 1" uma semana após a saída de creche (sete dias de alojamento no crescimento e/ou 70 dias de idade), foi embasada na verificação de possíveis lesões por agentes causadores de pneumonia neste período e maior desafio, pois, os animais mudam de ambiente/instalação. A "NECROPSIA 2" foi efetuada na fase final de crescimento (63 dias de alojamento no crescimento e/ou 126 dias de idade). A escolha desta data para realização da necropsia deveu-se a possível visualização de lesões causadas por *M. hyopneumoniae* porque estas poderiam estar cicatrizadas quando da avaliação por ocasião do abate.

Dos animais necropsiados foram colhidos fragmentos dos diferentes órgãos, com destaque aos do sistema respiratório. Amostras foram colhidas de corneto nasal, traqueia, linfonodo traqueobrônquico e dos lobos pulmonares, independente da presença de lesões macroscópicas, foram colhidos fragmentos de lobos craniais/apicais direito e esquerdo, médios/cardíacos direito e esquerdo, intermediário/acessório e, no caso dos lobos caudais direito e esquerdo foi colhida apenas uma amostra, sendo agrupados os dois lobos. Para os animais de abate, foram colhidos fragmentos de todos os lobos pulmonares com áreas de consolidação. Os fragmentos de tecido pulmonar foram colhidos em área de transição de lesão (área lesionada e sadia) quando existia lesão, sempre contendo pleura e vias aéreas (brônquios e bronquíolos). O tamanho dos fragmentos foi de 1,5 cm e os mesmos foram acondicionados em frascos com formol tamponado a 10% por 48 horas.

3.2.5 Análises Laboratoriais

3.2.5.1 Teste de ELISA - NP e inibição da hemaglutinação

O teste sorológico utilizado foi um ELISA comercial Influenza A-Ab test®(IDEXX Laboratories Inc) que identifica anticorpos para a nucleoproteína do vírus influenza A. O teste não diferencia anticorpos específicos aos subtipos virais bem como se o animal foi exposto ao vírus ou vacinado. As amostras foram testadas de acordo com o recomendado pelo fabricante e a razão S/N (sample-to-negative) foi calculada baseada na densidade ótica (DO) (DO da amostra / DO média do controle negativo). Amostras com S/N menor que 0,60 foram consideradas positivas. A sensibilidade do teste é de 95,4% e a especificidade de 99,7% sendo considerado seguro na indicação do estado de infecção do animal (GOODELL et al., 2014).

O teste de HI foi realizado com objetivo de verificar a especificidade dos anticorpos detectados no soro dos suínos frente ao subtipo viral utilizado na vacina. O teste foi realizado apenas com os animais do grupo G2 que foi o que apresentou maior número de suínos respondentes com anticorpos frente ao teste de ELISA - NP. O vírus utilizado no teste de HI foi o mesmo utilizado para produção da vacina, sendo que a maior diluição positiva foi considerado resultado de titulação. Títulos menores que 10 foram considerados negativos, entre 10 e 20 suspeitos e acima de 40 considerados protetores.

3.2.5.2 Reação de PCR convencional e RT-PCR quantitativa em tempo real

Fragmentos pulmonares de animais necropsiados e abatidos e secreção nasal foram testados para presença de FLUAV através da técnica de RT-qPCR. O RNA viral foi extraído utilizando o kit MagMAX (Ambion®) e as amostras

foram testadas por RT-qPCR para Influenza A conforme descrito por Zhang & Harmon (2014).

Todas as amostras de pulmão (n=408) foram testadas por qPCR para PCV2 (OPRIESSNIG et al., 2004) e por PCR convencional para *M. hyopneumoniae* (OTAGIRI et al., 2005). Para pesquisa de *P. multocida* foram escolhidas apenas amostras com lesão histológica de broncopneumonia supurativa ou catarral, ou seja, as que continham lesão indicativa de envolvimento bacteriano secundário devido à presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear. A técnica de PCR seguiu o descrito por Townsend et al. (2001) para teste de 80 amostras com broncopneumonia catarral e 49 amostras com broncopneumonia supurativa totalizando 129 pulmões. O DNA bacteriano e viral foram extraídos utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante.

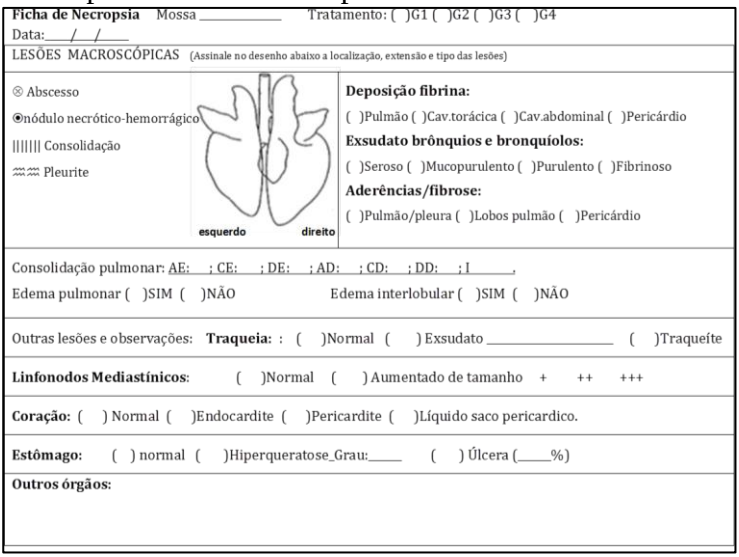
3.2.5.3 Avaliação Anatomopatológica

3.2.5.3.1 Macroscopia

Durante a execução das necropsias foram descritas as lesões pulmonares e extra-pulmonares em ficha específica (Figura 3). O objetivo principal da necropsia foi à avaliação e colheita de pulmão. As lesões pulmonares macroscópicas foram descritas quanto à severidade, coloração, consistência e presença de exsudato, bem como distribuição anatômica. A área pulmonar foi quantificada baseada na área afetada de cada um dos sete lobos pulmonares seguindo proposto por Madec e Kolbisch (1982) e Lyoo et al. (2014). Outras lesões como pleurite, exsudação de fibrina, presença de abscessos e/ou nódulos necro-hemorrágicos, além de edema interlobular e alterações de linfonodo traqueobrônquico também foram avaliados. Todas as alterações extra-pulmonares foram anotadas quanto ao tipo de lesão, extensão e gravidade.

A área de lesão pulmonar foi classificada de acordo com a porcentagem total de cada lobo pulmonar afetado seguindo o descrito por Madec & Kolbisch (1982) e Lyoo et al. (2014). A graduação 0 corresponde a ausência de lesão; graduação 1 corresponde de 1 a 25% de área pulmonar afetada (pneumonia leve); graduação 2 com 26 a 50% de área afetada (pneumonia moderada); graduação 3 (pneumonia severa) com 51 a 75% de área afetada; e graduação 4 (pneumonia muito severa) mais de 75% do pulmão afetado.

Figura 3 Ficha de acompanhamento de necropsia com descrição de lesões pulmonares e extra-pulmonares.



Ficha de Necropsia Mossa _____ Tratamento: ( )G1 ( )G2 ( )G3 ( )G4
Data:____/___/____

LESÕES MACROSCÓPICAS (Assinale no desenho abaixo a localização, extensão e tipo das lesões)

⊗ Abscesso
⦿nódulo necrótico-hemorrágico
|||||| Consolidação
〰〰 Pleurite

esquerdo direito

Deposição fibrina:
( )Pulmão ( )Cav.torácica ( )Cav.abdominal ( )Pericárdio
Exsudato brônquios e bronquíolos:
( )Seroso ( )Mucopurulento ( )Purulento ( )Fibrinoso
Aderências/fibrose:
( )Pulmão/pleura ( )Lobos pulmão ( )Pericárdio

Consolidação pulmonar: AE: ; CE: ; DE: ; AD: ; CD: ; DD: ; I ,
Edema pulmonar ( )SIM ( )NÃO Edema interlobular ( )SIM ( )NÃO

Outras lesões e observações: **Traqueia:** : ( )Normal ( ) Exsudato _____ ( )Traqueíte

Linfonodos Mediastínicos: ( )Normal ( ) Aumentado de tamanho + ++ +++

Coração: ( ) Normal ( )Endocardite ( )Pericardite ( )Líquido saco pericardico.

Estômago: ( ) normal ( )Hiperqueratose_Grau:_____ ( ) Úlcera (_____%)

Outros órgãos:

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Depois de quantificada a área de lesão, foi calculada a área média de lesão por pulmão e índice para pneumonia dos grupos tratamento seguindo descrito por Pifffer & Brito (1991). Além disto, fragmentos de 1,5 cm de tecido pulmonar de todos os lobos pulmonares com lesão macroscópica foram colhidos em área de transição de lesão, contendo pleura e vias aéreas

(brônquios e/bronquíolos), e fixados em formalina tamponada a 10%. Pulmões sem lesões macroscópicas foram amostrados no lobo cardíaco esquerdo.

3.2.5.3.2 Histopatologia

Amostras colhidas de animais necropsiados ou abatidos, após fixação em formalina tamponada a 10%, foram clivadas em aproximadamente 3 mm, processados em histotécnico, incluídos em parafina, seccionados no micrótomo em cortes de 3 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E) segundo descrito por Prophet et al. (1992).

A descrição histológica seguiu o proposto por Hansen et al. (2010) e Kitikoon et al. (2012), com adaptações. A descrição contempla alterações inflamatórias, degenerativas, necróticas e circulatórias de brônquios, bronquíolos, alvéolos, interstício e tecido linfóide associado aos brônquios. Todas as alterações foram descritas de acordo com a intensidade em leve, moderada e acentuada. O diagnóstico morfológico foi definido de acordo com a proposta de López (2006) e Hansen et al. (2010). Para amostras com diagnóstico de pneumonia granulomatosa foi realizada coloração especial de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Grocott para identificação de hifas fúngicas.

3.2.5.4 Exame Imuno-histoquímico

Após a descrição das lesões histológicas, foi selecionada uma amostra (lobo com lesão, independente do tipo) representativa por animal para teste de IHQ. Os fragmentos de tecido pulmonar foram submetidos ao exame IHQ identificando a presença dos antígenos pesquisados relacionados às lesões histológicas. A descrição levou em consideração a intensidade de marcação para *M. hyopneumoniae* (CASTRO et al., 2009), FLUAV (VINCENT et al., 1997) e PCV2 (GAVA et al., 2005). Para pesquisa de *M. hyopneumoniae* foi utilizado o anticorpo

recombinante policlonal monoespecífico contra a proteína lactato-desidrogenase - P36, para FLUAV foi utilizado anticorpo monoclonal Anti-influenza A específico para nucleoproteína (MAB 8251 – Merck Millipore®) e para PCV2 anticorpo policlonal para proteína do capsídeo (Bs – 10057R – Bioss®).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram efetuadas com o software "Statistical Analysis System" (SAS, 2012). Os dados de avaliação de desempenho (ganho de peso e conversão alimentar), bem como monitoria clínica (tosse e espirro) foram analisados por meio da análise de medidas repetidas, considerando os efeitos de bloco, grupo, idade dos leitões, a interação entre os dois últimos fatores e 16 tipos de estruturas de matriz de variâncias e covariâncias, usando o PROC MIXED conforme Xavier (2000). A estrutura usada na análise foi escolhida com base no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC). O método de estimação usado foi o de máxima verossimilhança restrita. O desdobramento da análise para o efeito da interação foi realizado através do teste F para comparar o efeito de grupo em cada idade dos leitões.

A ocorrência de lesões macroscópicas de consolidação pulmonar foi avaliada por meio do teste Exato de Fisher calculado para os animais necropsiados e abatidos, sendo avaliado o efeito de grupo sobre a presença de consolidação pulmonar. Para análise da área pulmonar total afetada por lesão foi usado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos, considerando também, animais necropsiados separados dos abatidos. As lesões histológicas foram agrupadas por diagnóstico morfológico e o efeito de grupo sobre o diagnóstico morfológico e os escores de cada tipo de lesão foram avaliados por meio do teste Exato de Fisher. A frequência de *M. hyopneumoniae* nos grupos também foi calculada pelo teste

Exato de Fisher para os animais necropsiados e os abatidos. Os valores mínimos e máximos de temperatura foram apresentados na forma de dados médios e os valores de ELISA – NP pela porcentagem de animais positivos em cada grupo.

4 RESULTADOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados de peso ao nascer, peso ao desmame e idade ao desmame separados por grupo estão demonstrados na Tabela 1. Como os animais foram bloqueados em grupos aleatórios através do programa estatístico SAS (2012), a média de peso entre os grupos tratamento foi uniforme. A variação entre os grupos não interferiu nos resultados uma vez que, todos os tratamentos possuiam baias de animais leves, médios e pesados; machos e fêmeas.

Tabela 1 Casualização de grupos de acordo com a distribuição dos animais por sexo, peso e idade ao desmame.

		Sexo		Peso (kg)		Idade (dias)
Grupo	N†	Macho	Fêmea	Nascer (máx - min)	Desmame* (máx - min)	
1	105	49 (46,7%)	56 (53,3%)	1,55 (0,82-2,40)	5,88 (3,50-7,85)	20,63 (17-28)
2	105	49 (46,7%)	56 (53,3%)	1,64 (1,00-2,34)	5,85 (3,40-7,75)	20,52 (15-26)
3	105	49 (46,7%)	56 (53,3%)	1,59 (0,9-2,52)	5,87 (3,50-7,70)	20,70 (15-26)
4	105	49 (46,7%)	56 (53,3%)	1,62 (0,89-2,36)	5,88 (3,35-7,75)	20,71 (17-28)
	420	196 (46,7%)	224 (53,3%)	1,60 (0,82-2,52)	5,87 (3,35-7,85)	20,64 (15-28)

*Casualizados aleatoriamente por peso de desmame. N= número de animais. †Número de leitões ao início do experimento. No decorrer do período ocorreram mortes não citadas na tabela.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Durante o experimento ocorreu mortalidade de animais na fase de creche e crescimento e terinação. O total de animais mortos foi 12 (2,85%), sendo 58,33% (7/12) na fase de creche e 41,67% (5/12) na fase de crescimento/terminação. As principais causas identificadas foram: caquexia, broncopneumonia, pericardite, ruptura hepática, meningite, artrite e torção de mesentério.

4.2 ATIVIDADES NA GRANJA

4.2.1 Avaliação zootécnica

Não foi verificada diferença significativa entre os grupos e idades dos leitões para as variáveis de desempenho: conversão alimentar, consumo alimentar e ganho de peso. Foi detectado efeito significativo para bloco e idade. A Tabela 2 demonstra os dados de conversão alimentar acumulada e consumo médio de ração diário acumulado no período de crescimento e terminação.

Os dados médios de peso acumulado e ganho de peso diário acumulado nas fases de crescimento e terminação estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 2 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – Conversão alimentar acumulada e consumo ração diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões (continua)

	Controle	Vacinados			
	G1	G2	G3	G4	
Idade	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15	Pr>F*
Conversão Alimentar Acumulada					
63	1,674± 0,021	1,689± 0,024	1,662± 0,020	1,684± 0,016	0,8416
70	1,790± 0,013	1,787± 0,023	1,769± 0,026	1,799± 0,020	0,8575

Tabela 2 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – Conversão alimentar acumulada e consumo ração diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões (conclusão).

	Controle	Vacinados			
	G1	G2	G3	G4	
Idade	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15	Pr>F*
84	1,858± 0,016	1,855± 0,018	1,834± 0,022	1,871± 0,020	0,7337
98	1,995± 0,018	1,977± 0,019	1,959± 0,017	1,988± 0,020	0,5126
112	2,113± 0,019	2,110± 0,020	2,079± 0,019	2,110± 0,017	0,4142
126	2,237± 0,020	2,238± 0,023	2,213± 0,020	2,229± 0,019	0,5685
140	2,361± 0,019	2,358± 0,026	2,348± 0,019	2,361± 0,018	0,8900
154	2,482± 0,020	2,468± 0,027	2,462± 0,020	2,478± 0,021	0,7373
Consumo Ração Diário Acumulado					
63	0,640± 0,016	0,657± 0,017	0,648± 0,015	0,667± 0,018	0,6688
70	0,685± 0,016	0,705± 0,017	0,690± 0,015	0,711± 0,018	0,5721
84	0,849± 0,022	0,859± 0,019	0,845± 0,018	0,869± 0,024	0,6202
98	1,005± 0,028	1,023± 0,021	1,003± 0,022	1,023± 0,028	0,6721
112	1,176± 0,031	1,193± 0,026	1,155± 0,025	1,182± 0,033	0,4684
126	1,367± 0,035	1,375± 0,030	1,336± 0,029	1,363± 0,035	0,4390
140	1,552± 0,035	1,559± 0,033	1,519± 0,034	1,551± 0,035	0,5480
154	1,691± 0,038	1,691± 0,036	1,659± 0,038	1,689± 0,038	0,7164

Nível descritivo de probabilidade do teste F. n= número de baias
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 3 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – peso e ganho de peso diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões (continua).

	Controle	Vacinados			
	G1	G2	G3	G4	
Idade	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15	Pr>F*
Peso acumulado					
21	5,880± 0,199	5,857± 0,199	5,877± 0,195	5,885± 0,199	0,0665
63	21,95± 0,52	22,19± 0,47	22,24± 0,46	22,52± 0,53	0,7531
70	24,50± 0,60	25,03± 0,51	24,83± 0,46	25,11± 0,58	0,7468
84	34,70± 0,86	35,02± 0,68	34,95± 0,76	35,15± 0,85	0,9717
98	44,48± 1,16	45,49± 0,75	45,12± 0,98	45,31± 1,07	0,8730
112	56,39± 1,36	57,12± 1,00	56,32± 1,19	56,68± 1,40	0,9604
126	69,83± 1,44	70,13± 1,05	69,10± 1,39	69,88± 1,40	0,9430
140	84,04± 1,60	84,45± 1,18	82,83± 1,62	84,00± 1,49	0,8592
154	96,39± 1,62	96,95± 1,47	95,42± 1,79	96,45± 1,58	0,9137
Ganho de Peso Diário Acumulado					
63	0,383± 0,010	0,389± 0,009	0,390± 0,007	0,396± 0,009	0,7010
70	0,383± 0,010	0,395± 0,009	0,390± 0,006	0,396± 0,010	0,5057
84	0,457± 0,012	0,463± 0,009	0,461± 0,010	0,464± 0,012	0,9117
98	0,504± 0,014	0,517± 0,009	0,512± 0,011	0,515± 0,013	0,6685
112	0,557± 0,014	0,565± 0,010	0,556± 0,012	0,560± 0,014	0,8644
126	0,611± 0,012	0,614± 0,009	0,604± 0,012	0,611± 0,012	0,7825

Tabela 3 Médias e erros-padrão das variáveis de desempenho – peso e ganho de peso diário acumulado em função do grupo e da idade dos leitões (conclusão).

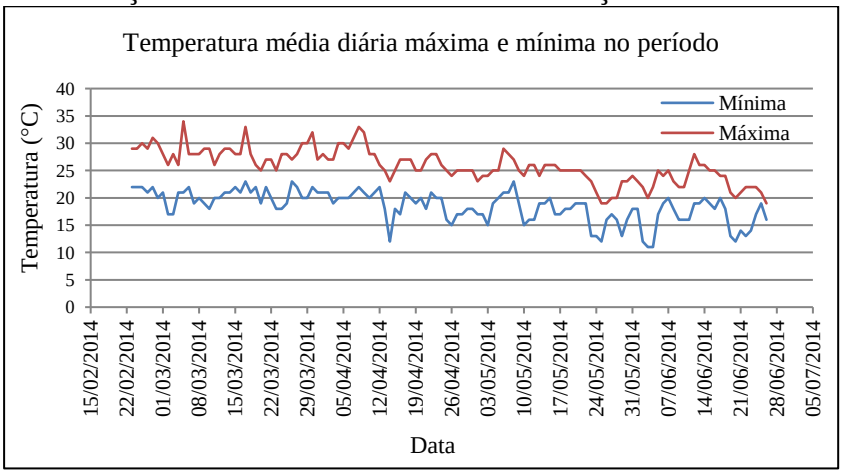
	Controle	Vacinados			
	G1	G2	G3	G4	
Idade	n= 15	n= 15	n= 15	n= 15	Pr>F*
140	0,657± 0,013	0,660± 0,009	0,647± 0,013	0,656± 0,012	0,5628
154	0,681± 0,012	0,685± 0,011	0,673± 0,013	0,681± 0,012	0,7086

Nível descritivo de probabilidade do teste F. n= número de baias
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

4.2.2 Controle da temperatura das instalações

Na figura 4 são demonstrados os dados da a temperatura média máxima e mínima (semanal) das salas de crescimento e terminação.

Figura 4 Temperatura média semanal (máxima e mínima) dentro da instalação da fase de crescimento e terminação.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

4.2.3 Monitoria clínica

O teste F da análise de medidas repetidas não detectou efeito significativo para grupo, bloco e para interação grupo×idade dos leitões para tosse e espirro. Somente foi detectado efeito significativo para a idade. A Tabela 4 ilustra os resultados obtidos para espirro e a Tabela 5 para tosse.

4.2.4 Análises sorológicas

Das 54 fêmeas, vinte e quatro (44,4%) foram soropositivas e 30 (55,6%) soronegativas para FLUAV. A razão S/N das mães soropositivas variou de 0,136 a 0,517. Do total de 420 leitões, 171 (40,7%) eram filhos de fêmeas soropositivas e 249 (59,3%) de fêmeas soronegativas. Ao avaliar leitões oriundos de fêmeas soropositivas, 80 (46,8%) foram soropositivos ao desmame (21 dias) e 91 (53,2%) foram soronegativos para FLUAV. O perfil de soropositividade demonstra que ao desmame, 80 (46,8%) foram positivos, aos 34 dias apenas 18 (22,5%) e aos 55 dias de idade todos os leitões foram soronegativos para FLUAV, sendo o período após os 35 dias o ideal para vacinação.

Tabela 4 Médias e erros-padrão de espirro em função do grupo e da idade dos leitões (continua).

Idade	Controle	Vacinados			Pr>F*
	G1 (n=15)	G2 (n=15)	G3 (n=15)	G4 (n=15)	
35	0,067± 0,067	0,467± 0,192	0,200± 0,107	0,267± 0,118	0,1715
42	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,133± 0,091	0,333± 0,159	0,2287
49	0,400± 0,214	0,333± 0,159	0,133± 0,091	0,333± 0,211	0,7423
56	0,667± 0,252	0,533± 0,192	0,667± 0,333	0,400± 0,163	0,8392

Tabela 4 Médias e erros-padrão de espirro em função do grupo e da idade dos leitões (conclusão).

Idade	Controle	Vacinados			Pr>F*
	G1 (n=15)	G2 (n=15)	G3 (n=15)	G4 (n=15)	
63	0,733± 0,267	0,733± 0,330	0,600± 0,214	0,400± 0,163	0,7593
70	0,333± 0,211	0,467± 0,192	0,200± 0,107	0,400± 0,190	0,7465
77	0,000	0,200± 0,107	0,133± 0,091	0,000	0,1099
84	0,200± 0,107	0,000	0,267± 0,206	0,133± 0,091	0,4601
91	0,133± 0,091	0,133± 0,133	0,200± 0,107	0,400± 0,190	0,4516
98	0,533± 0,291	0,200± 0,145	0,400± 0,190	0,400± 0,235	0,7511
105	0,733± 0,248	0,267± 0,118	0,333± 0,159	0,400± 0,131	0,2195
112	0,333± 0,187	0,733± 0,267	0,200± 0,145	0,133± 0,091	0,0987
119	0,000	0,067± 0,067	0,267± 0,153	0,333± 0,159	0,1376
126	0,133± 0,091	0,467± 0,192	0,133± 0,091	0,133± 0,133	0,2012
133	0,133± 0,091	0,267± 0,153	0,333± 0,159	0,067± 0,067	0,4261
140	0,133± 0,091	0,200± 0,107	0,400± 0,163	0,133± 0,091	0,3284
147	0,200± 0,107	0,200± 0,107	0,067± 0,067	0,333± 0,159	0,4518
154	0,200± 0,107	0,133± 0,133	0,133± 0,091	0,133± 0,091	0,9593

Nível descritivo de probabilidade do teste F. n= número de baias.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 5 Médias e erros-padrão de tosse em função do grupo e da idade dos leitões.

Idade	Controle	Vacinados			Pr>F*
	G1 (n=15)	G2 (n=15)	G3 (n=15)	G4 (n=15)	
49	0,000	0,000	0,067± 0,067	0,000	0,9765
56	0,200± 0,200	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,000	0,7269
63	0,000	0,000	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,9645
70	0,000	0,000	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,9645
77	0,067± 0,067	0,000	0,067±0 ,067	0,000	0,9645
84	0,067± 0,067	0,000	0,200± 0,145	0,000	0,6472
91	0,267± 0,267[a]	0,133± 0,133[a]	0,200± 0,145[a]	0,667± 0,540[b]	0,0139
98	0,200± 0,107	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,133± 0,133	0,8594
105	0,067± 0,067	0,000	0,000	0,267± 0,153	0,3977
112	0,000	0,267± 0,153	0,200± 0,200	0,267± 0,118	0,3977
119	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,067± 0,067	0,267± 0,206	0,6019
126	0,133± 0,091	0,333± 0,159	0,133± 0,133	0,200± 0,145	0,6472
133	0,467± 0,322[b]	0,200± 0,145[ab]	0,000[a]	0,067± 0,067[a]	0,0481
140	0,067± 0,067	0,400± 0,214	0,200± 0,107	0,267± 0,206	0,3106
147	0,133± 0,133	0,000	0,067± 0,067	0,200± 0,145	0,7106
154	0,000	0,067± 0,067	0,200± 0,107	0,200± 0,145	0,6019

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste T protegido ($P \leq 0,05$). n= número de baias.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Dos animais vacinados e controle, no teste de ELISA – NP verificou-se que o grupo que apresentou melhor resposta foi o G2 com pouco mais de 30% de soroconversão na quinta colheita de soro, aos 98 dias. É possível observar que a resposta à vacinação se dá após os 56 dias de vida, momento em que foi realizada a segunda dose da vacina (Figura 5).

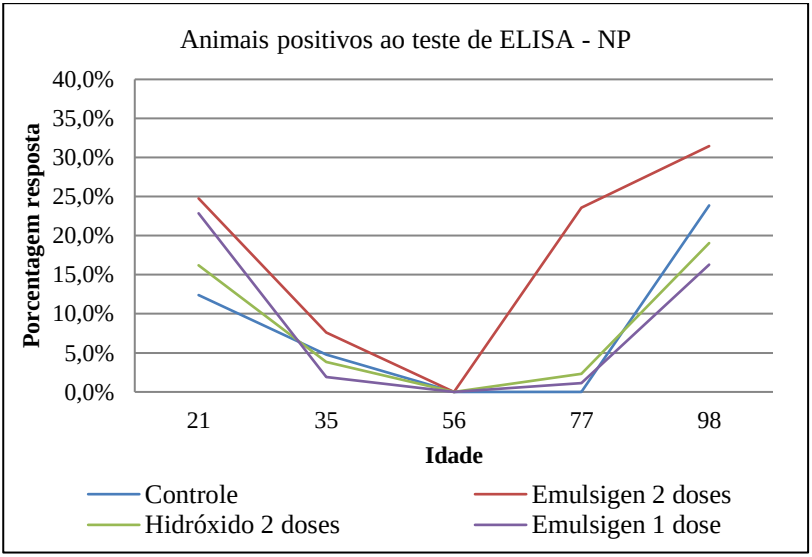
Os animais do G2 – Emulsigen - D® 2 doses, que apresentou a melhor resposta a vacinação pelo teste de ELISA – NP foi submetido ao teste de HI para confirmar se os anticorpos detectados no teste de ELISA – NP eram específicos para o antígeno utilizado na vacina (H1N1pdm09). Do total de animais do G2 (103 suínos) 19,05% (20 animais) foram positivos pelo teste de inibição da hemaglutinação apresentando títulos entre 1:40 e 1:160. A amostra de sangue foi colhida aos 76 dias de idade período que corresponde a 21 dias posteriores à segunda dose da vacina.

4.2.4 Caracterização Etiopatológica

Os resultados apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 indicam que não houve efeito significativo do grupo e momento de avaliação (necropsia 1, 2 e abate) sobre a área pulmonar total afetada por lesão de consolidação (Figura 6) bem como na porcentagem de animais com lesões de consolidação pulmonar. Todos os grupos, quando avaliados ao abate demonstraram lesões significativas, e nos animais dos grupos vacinados as lesões foram mais expressivas.

Nas mesmas tabelas (Tabela 6, 7 e 8) são apresentados os resultados das lesões histológicas onde se observa efeito significativo do grupo na ocorrência de lesão histológica somente na necropsia 1.

Figura 5 Animais positivos no teste de ELISA – NP nos diferentes momentos, desde o desmame até 98 dias de vida.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 6 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 70 dias – Necropsia 1 (continua)

	Controle	Vacinados			Pr<x^2
	G1 n=15	G2 n=15	G3 n=15	G4 n=15	
Lesões pulmonares					
% Área média afetada	1,413± 0,767	0,747± 0,353	2,613± 1,422	0,227± 0,227	0,1950*
% Consolidação	26,67 (4/15)	26,67 (4/15)	40,00 (6/15)	6,67 (1/15)	0,2301▲
% Lesão histológica	60,00	100,00[b]	80,00[ab]	60,00[a]	0,0321
BALT					0,2511
Ausente	46,67	73,33	60,00	53,33	
Leve	40,00	26,67	40,00	46,67	
Moderado	13,33	0,00	0,00	0,00	
Broncopneumonia catarral					0,4476
Ausente	93,33	80,00	93,33	93,33	
Leve	0,00	6,67	0,00	6,67	
Moderado	0,00	13,33	6,67	0,00	
Acentuado	6,67	0,00	0,00	0,00	
Broncopneumonia supurativa					0,5371
Ausente	93,33	93,33	93,33	100,00	
Leve	0,00	6,67	0,00	0,00	
Moderado	6,67	0,00	6,67	0,00	

Tabela 6 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 70 dias – Necropsia 1 (conclusão)

	Controle	Vacinados			Pr<x^2
	G1 n=15	G2 n=15	G3 n=15	G4 n=15	
Pneumonia intersticial					0,2493
Ausente	53,33	26,67	33,33	33,33	
Leve	33,33	20,00	40,00	20,00	
Moderado	13,33	53,33	26,67	26,67	
Pneumonia granulomatosa					
Ausente	100,00	100,00	100,00	100,00	

*P = Nível descritivo de probabilidade do teste de Kruskal-Wallis; ▲ P = Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher. n= número de animais.

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 7 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 126 dias – Necropsia 2 (continua).

	Controle	Vacinados			Pr<x^2
	G1 n=15	G2 n=15	G3 n=15	G4 n=15	
Lesões pulmonares					
% Área média afetada	6,833± 4,000	3,573± 1,919	2,260± 0,798	2,607± 0,970	0,7840
% Consolidação	40,00 (6/15)	66,67 (10/15)	73,33 (11/15)	60,00 (9/15)	0,3538▲
% Lesão histológica	93,33	100,00	86,67	86,67	0,4936
BALT					0,7466
Ausente	60,00	46,67	46,67	46,67	
Leve	33,33	40,00	40,00	46,67	
Moderado	6,67	40,00	40,00	46,67	
Acentuado	0,00	0,00	0,00	6,67	
Broncopneumonia catarral					0,3583
Ausente	93,33	73,33	66,67	86,67	
Leve	0,00	13,33	6,67	0,00	
Moderado	6,67	13,33	26,67	13,33	
Broncopneumonia supurativa					0,7834
Ausente	86,67	93,33	100,00	86,67	
Leve	6,67	0,00	0,00	6,67	
Moderado	6,67	6,67	0,00	6,67	

Tabela 7 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais necropsiados aos 126 dias – Necropsia 2 (conclusão).

	Controle		Vacinados		$Pr<x^2$
	G1 n=15	G2 n=15	G3 n=15	G4 n=15	
Pneumonia intersticial					0,4775
Ausente	26,67	33,33	46,67	46,67	
Leve	13,33	40,00	26,67	26,67	
Moderado	53,33	26,67	26,67	26,67	
Acentuado	6,67	0,00	0,00	0,00	
Pneumonia granulomatosa					
Ausente	100,00	100,00	100,00	100,00	

*P = Nível descritivo de probabilidade do teste de Kruskal-Wallis; ▲ P = Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher. n= número de animais.

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 8 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais abatidos aos 156 dias (continua).

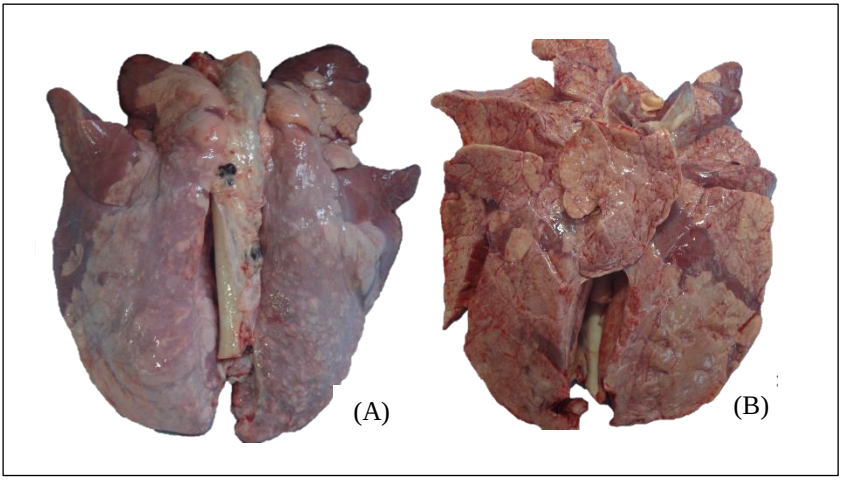
	Controle	Vacinados			Pr<x^2
	G1 n=72	G2 n=73	G3 n=69	G4 n=74	
Lesões pulmonares					
Área média afetada (%)	2,431± 0,692	5,236± 1,199	4,737± 1,310	4,867± 0,999	0,1106*
% consolidação	48,61 (35/72)	67,12 (49/73)	62,32 (43/69)	63,51 (47/74)	0,1194▲
IPP**	0,58	0,91	0,78	0,90	
% Lesão histológica	51,39	67,12	62,32	64,86	0,2163
BALT	a	b	b	b	0,0094
Ausente	65,28	41,10	56,52	41,89	
Leve	5,56	27,40	21,74	29,73	
Moderado	19,44	24,66	18,84	18,92	
Acentuado	9,72	6,85	2,90	9,46	
Broncopneumonia catarral					0,2944
Ausente	86,11	71,23	73,91	82,43	
Leve	5,56	6,85	10,14	1,35	
Moderado	6,94	19,18	13,04	13,51	
Acentuado	1,39	2,74	2,90	2,70	
Broncopneumonia supurativa					0,6082
Ausente	86,11	82,19	92,75	82,43	
Leve	1,39	12,33	5,80	12,16	
Moderado	11,11	12,33	5,80	12,16	
Acentuado	1,39	0,00	0,00	1,35	

Tabela 8 Médias e erros-padrão de área pulmonar total afetada, prevalência de consolidação pulmonar (porcentagem e número de suínos com lesão pulmonar/número de avaliados) e lesões histológicas em função do grupo para animais abatidos aos 156 dias (conclusão).

	Controle	Vacinados			$Pr<x^2$
	G1 n=72	G2 n=73	G3 n=69	G4 n=74	
Pneumonia intersticial					0,5056
Ausente	87,50	91,78	79,71	82,43	
Leve	11,11	6,85	15,94	12,16	
Moderado	1,39	1,37	4,35	4,05	
Acentuado	0,00	0,00	0,00	1,35	
Pneumonia granulomatosa					0,9714
Ausente	95,83	97,26	95,65	95,95	
Leve	2,78	1,37	2,90	1,35	
Moderado	1,39	1,37	1,45	2,70	

*P = Nível descritivo de probabilidade do teste de Kruskal-Wallis; ▲P = Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher. n= número de animais. ** IPP: índice para pneumonia.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 6 Lesão de consolidação vermelho-escura bem delimitada com localização crânio-ventral (A) e atingindo lobo caudal (B).



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Nas Tabelas 9, 10 e 11 são demonstradas combinações dos diferentes diagnósticos morfológicos baseados nos diferentes tipos de lesões histológicas observadas nos pulmões de animais necropsiados e abatidos para os diferentes grupos. Na figura 7 se observa lesão de broncopneumonia supurativa com infiltração de macrófagos e neutrófilos em alvéolos e na figura 8 uma intensa reação de hiperplasia do tecido linfoide associado aos brônquios.

Tabela 9 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais necropsiados aos 70 dias.

	Controle	Vacinados			
Diagnóstico morfológico	G1 (n= 15)	G2 (n= 15)	G3 (n= 15)	G4 (n= 15)	P* 0,2164
Negativo	40,00	0,00	20,00	40,00	
BALT	0,00	6,67	0,00	6,67	
Catarral	0,00	6,67	0,00	0,00	
Catarral+ BALT	6,67	6,67	6,67	6,67	
Catarral+ Intersticial	0,00	6,67	0,00	0,00	
Intersticial	6,67	53,33	33,33	13,33	
Intersticial + BALT	40,00	13,33	33,33	33,33	
Supurativa	0,00	6,67	6,67	0,00	
Supurativa + BALT	6,67	0,00	0,00	0,00	

*P = Nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado; n= número de animais.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 10 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais necropsiados aos 126 dias.

	Controle	Vacinados			
Diagnóstico morfológico	G1 (n= 15)	G2 (n= 15)	G3 (n= 15)	G4 (n= 15)	P* 0,6576
Negativo	6,67	0,00	13,33	13,33	
BALT	0,00	0,00	0,00	6,67	
Catarral	6,67	13,33	6,67	6,67	
Catarral+ BALT	0,00	13,33	26,67	6,67	
Intersticial	46,67	33,33	26,67	20,00	
Intersticial +BALT	26,67	33,33	26,67	33,33	
Supurativa	0,00	0,00	0,00	6,67	
Supurativa + BALT	13,33	6,67	0,00	6,67	

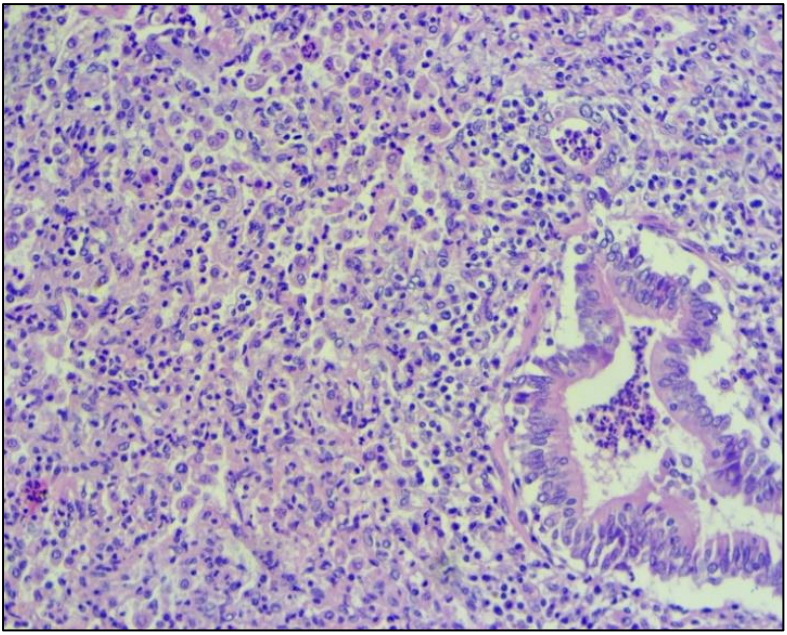
*P = Nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado; n= número de animais.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 11 Porcentagem de suínos classificados por diagnóstico morfológico das lesões pulmonares em função do grupo para animais abatidos aos 156 dias.

Diagnóstico morfológico	Controle	Vacinados			
	G1 (n= 72)	G2 (n= 73)	G3 (n= 69)	G4 (n= 74)	P* 0,0382
Negativo	48,61	32,88	37,68	35,14	
BALT	6,94	9,59	7,25	8,11	
Catarral	2,78	1,37	7,25	2,70	
Catarral+ BALT	11,11	27,40	18,84	14,86	
GRA**	4,17	2,74	4,35	4,05	
Intersticial	4,17	1,37	2,90	0,00	
Intersticial +BALT	8,33	6,85	14,49	17,57	
Supurativa	5,56	2,74	1,45	0,00	
Supurativa +BALT	8,33	15,07	2,90	17,57	
Supurativa+ Intersticial	0,00	0,00	2,90	0,00	

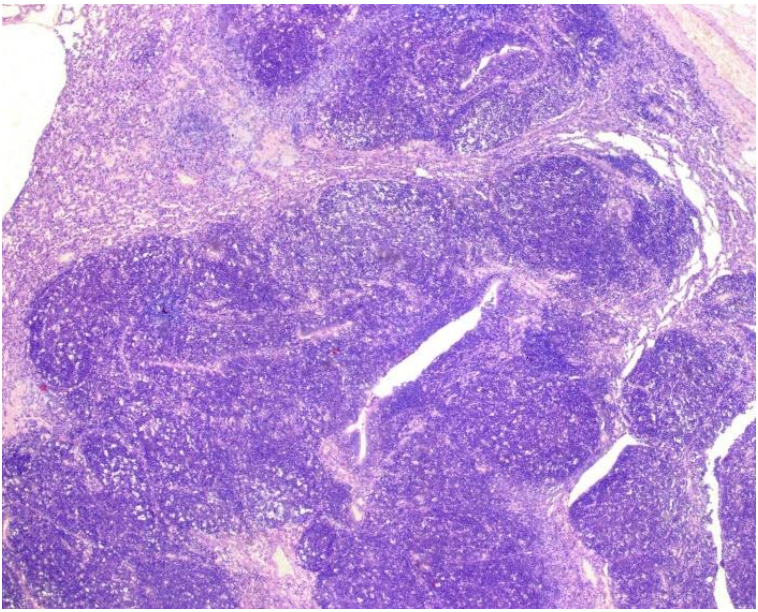
*P = Nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado; ** Pneumonia Granulomatosa; n= número de animais.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Figura 7 Corte histológico de pulmão com broncopneumonia supurativa e infiltrado de macrófagos e neutrófilos na luz alveolar. Objetiva de 20X.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

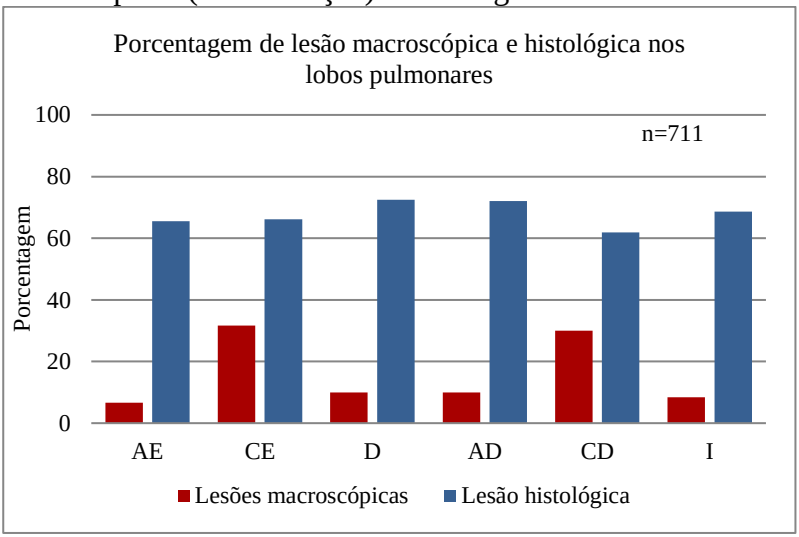
Figura 8 Corte histológico de pulmão com hiperplasia de BALT intensa. Objetiva de 20X.



Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Foram avaliados na macroscopia e microscopia 719 lobos pulmonares com e sem lesão. O lobo mais frequentemente acometido por lesão foi o CE. Uma divergência entre achados da macroscopia e microscopia fica visível nos dados apresentados na Figura 6, sendo que, 62,75% (374/596) dos lobos sem lesão macroscópica apresentavam algum tipo de lesão histológica e 6,09% (7/115) com lesão macroscópica não apresentaram lesão histológica.

Figura 9 Frequência de lobos acometidos por lesões macroscópicas (consolidação) e histológicas



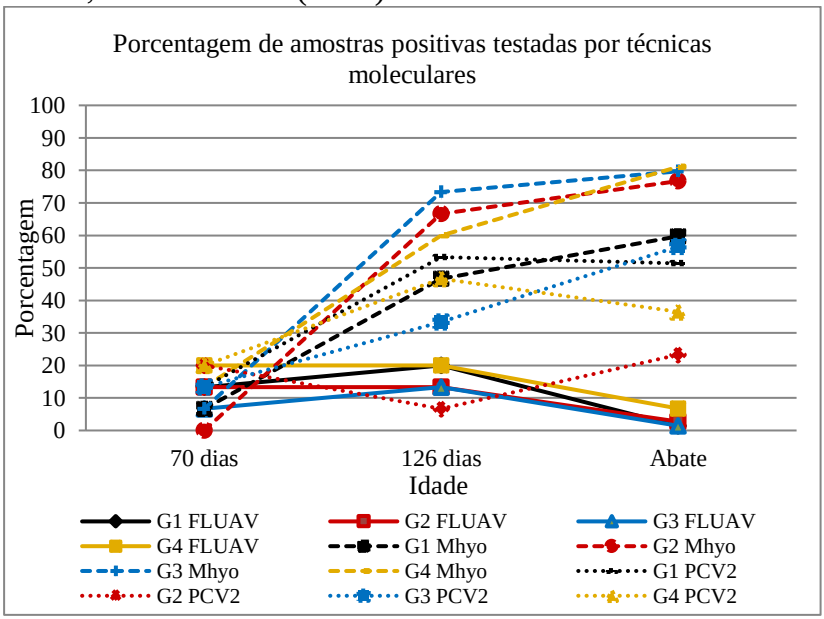
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

As principais lesões macroscópicas extra-pulmonares dos animais necropsiados incluindo as Necropsias 1 e 2, foram alterações de estômago relacionadas a hiperqueratose de quadrilátero esofágico (55,8%) e úlceras gástricas (12,5%). As lesões dignas de associação ao PRDC incluíam aumento de linfonodos mesentéricos e inguinais em 33,3% e 21,6% respectivamente.

A frequência de detecção dos agentes etiológicos por técnicas moleculares está demonstrada na Figura 7 e Tabela 12. A detecção do FLUAV pela técnica de RT-qPCR de 27 animais do grupo experimental indica que o vírus influenza circulou na granja durante o período do experimento. Cabe ressaltar que baseado nos resultados da RT-qPCR da secreção nasal, no momento do desmame, todos os animais eram negativos para o FLUAV. As cargas virais dos animais positivos variaram de 1,183 a 246 cópias tanto nos animais vacinados quanto nos animais do grupo controle.

A pesquisa de *P. multocida* foi realizada apenas em amostras que apresentavam algum grau de lesão histológica compatível com broncopneumonia supurativa ou catarral. Das 127 amostras testadas apenas 11 foram positivas (8,66%). Destas 11 amostras positivas, nove apresentavam lesão histológica de broncopneumonia supurativa, moderada, e, duas apresentavam broncopneumonia catarral. No teste de IHQ para FLUAV todas as amostras foram negativas, independente do momento avaliado. Para *M. hyopneumoniae* na necropsia 1 todos os animais foram negativos e nas demais, apresentou uma diferença numérica, mas sem diferença significativa.

Figura 10 Frequência (%) de amostras positivas para FLUAV, *M. hyopneumoniae* e PCV2 detectadas por técnicas moleculares aos 70, 126 e 156 dias (abate).



FLUAV= influenza A; Mhyo = *Mycoplasma hyopne*umoniae; PCV2 = Circovirus suíno tipo 2.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 12. Porcentagem de pulmões positivos na RT-qPCR para influenza, qPCR para circovirus suíno tipo 2 e PCR e imuno-histoquímica para *M. hyopneumoniae*. Nos parênteses, números de pulmões positivos em relação aos avaliados, em função do grupo para animais necropsiados aos 70 e 126 dias e abatidos aos 156 dias.

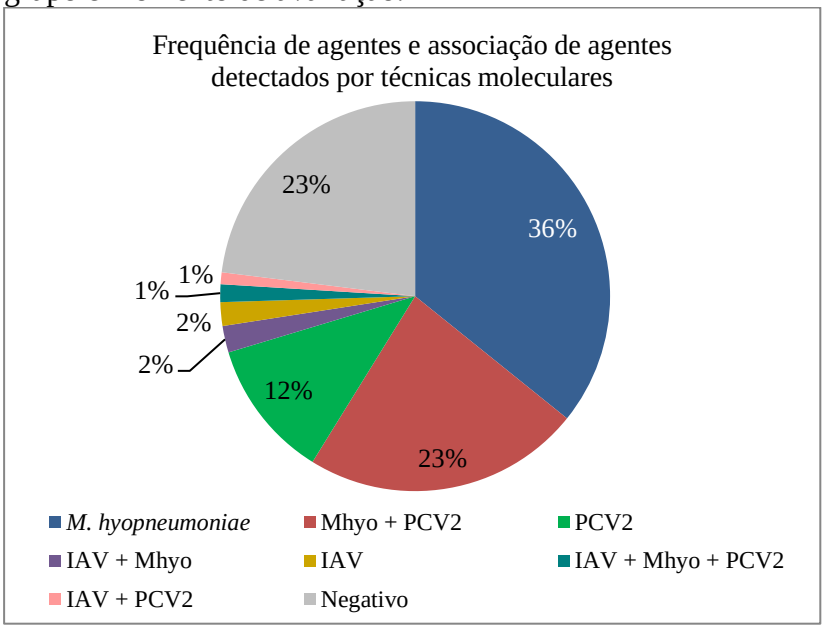
	Controle	Vacinados			
	G1	G2	G3	G4	
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	P*
Necropsia 1 70 dias					
FLUAV	13,33 (2/15)	13,33 (2/15)	6,67 (1/15)	20,00 (3/15)	0,9525
M. hyo[1]	6,67 (1/15)	0,0 (0/15)	6,67 (1/15)	13,33 (2/15)	0,8962
M. hyo[2]	0,0	0,0	0,0	0,0	
PCV2	13,33 (2/15)	20,00 (3/15)	13,33 (2/15)	20,00 (3/15)	1,0000
Necropsia 2 126 dias					
FLUAV	20,00 (3/15)	13,33 (2/15)	13,33 (2/15)	20,00 (3/15)	1,0000
M. hyo[1]	46,67 (7/15)	66,67 (10/15)	73,33 (11/15)	60,00 (9/15)	0,5567
M. hyo[2]	28,57 (4/14)	46,67 (7/15)	69,23 (9/13)	53,85 (7/13)	0,2160
PCV2	53,33 [b] (8/15)	6,67 [a] (1/15)	33,33[ab] (5/15)	46,67 [ab] (7/15)	0,0307
Abate 156 dias					
FLUAV	1,39 (1/72)	2,74 (2/73)	1,45 (1/69)	6,76 (5/74)	0,3390
M. hyo[1]	59,72 [a] (43/72)	76,71 [b] (56/73)	79,71[b] (55/69)	81,08 [b] (60/74)	0,0154
M. hyo[2]	56,76 (21/37)	63,27 (31/49)	69,23 (27/39)	57,45 (27/47)	0,6306
PCV2	51,39 [bc] (37/72)	23,29 [a] (17/73)	56,52 [c] (39/69)	36,49 [ab] (27/74)	0,0001

Porcentagens seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste exato de Fisher (≤0,05). *P = Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher. [1] PCR; [2] Imuno-histoquímica. n= número de animais. *M.hyo = Mycoplasma hyopneumoniae*.
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

4.3 INTERAÇÃO LESÃO E ETIOLOGIA

Considerando os suínos avaliados durante o período experimental, independente do grupo e momento em que ocorreram necropsias ou abate, é possível observar na Tabela 13 a relação entre histopatologia (nas distintas graduações/gravidade lesão) e frequência de detecção dos agentes, bem como, marcação por IHQ para *M. hyopneumoniae*. A frequência dos agentes também está descrita na Tabela 14 relacionado ao diagnóstico morfológico. Na Figura 8 são demonstradas as associações entre agentes diagnosticados por técnicas moleculares.

Figura 11 Frequência de agentes e associação destes detectados por técnicas moleculares nos suínos avaliados independente do grupo e momento de avaliação.



Fonte: produção do próprio autor, 2016

Tabela 13 Porcentagem de suínos positivos nas técnicas de IHQ para *M. hyopneumoniae* e moleculares para *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A de acordo com o tipo e graduação das lesões microscópicas no pulmão (continua).

		PCR			IHQ	
	n=408	FLUAV	PCV2	*M.hyo*[1]	n=271	*M.hyo*[1]
BALT						
P		0,6276	0,8772	<0,001		<0,001
Ausente	212	8,02	36,32	48,11	79	35,44
Leve	108	5,56	37,04	64,81	106	42,45
Moderado	66	6,06	40,91	96,97	64	75,00
Acentuado	22	0,00	31,82	86,36	22	54,55
Broncopneumonia catarral						
P		0,1369	0,7490	<0,001		0,0278
Ausente	328	6,10	36,28	57,01	192	31,37
Leve	22	0,00	40,91	81,82	22	54,55
Moderado	50	14,00	42,00	86,00	49	67,35
Acentuado	08	0,00	25,00	87,50	08	37,50
Broncopneumonia supurativa						
P		0,3616	0,3688	<0,001		0,3933
Ausente	359	6,69	35,93	58,77	223	47,53
Leve	12	16,67	58,33	91,67	11	63,64
Moderado	35	2,86	40,00	88,57	35	51,43
Acentuado	02	0,00	50,00	100,0	02	100,0
Pneumonia intersticial						
P		0,4775	0,5542	0,0148		<0,0001
Ausente	294	6,46	38,78	65,99	159	61,01
Leve	66	4,55	34,85	59,09	65	36,92
Moderado	46	10,87	30,43	43,48	45	22,22
Acentuado	02	0,00	0,00	100,0	02	100,0

Tabela 13 Porcentagem de suínos positivos nas técnicas de IHQ para *M. hyopneumoniae* e moleculares para *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A de acordo com o tipo e graduação das lesões microscópicas no pulmão (conclusão).

		PCR			IHQ	
	n=408	FLUAV	PCV2	*M.hyo*[1]	n=271	*M.hyo*[1]
Pneumonia granulomatosa						
P		1,000	0,4256	0,0229		0,0057
Ausente	397	6,80	36,52	61,46	260	47,31
Leve	06	0,00	50,00	100,0	06	83,33
Moderado	05	0,00	60,00	100,0	05	100,0

Porcentagens seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste exato de Fisher (≤0,05). *P = Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher. n= número de animais. [1]. *Mycoplasma hyopneumoniae*

Fonte: produção do próprio autor, 2016.

Tabela 14 Porcentagem de suínos positivos nas técnicas de IHQ para *M. hyopneumoniae* e moleculares para *M. hyopneumoniae*, PCV2 e influenza A de acordo com o diagnóstico morfológico independente do grupo e momento.

	PCR (n=408)				IHQ (n=271)	
	n	FLUAV	PCV2	*M.hyo*[1]	n	*M.hyo*[1]
Negativo	131	6,11	35,11	41,22	0	0,00
BALT	26	3,85	34,62	73,08	24	54,17
Catarral	16	25,00	37,50	87,50	15	53,33
Catarral+ BALT	63	4,76	41,27	85,71	63	63,49
Catarral+ Intersticial	1	0,00	0,00	0,00	1	0,00
GRA*	11	0,00	54,55	100,00	11	90,91
Intersticial	41	9,76	31,71	34,15	40	12,50
Intersticial+ BALT	70	5,71	32,86	64,29	69	43,48
Supurativa	10	10,00	50,00	70,00	10	40,00
Supurativa+ BALT	37	5,41	43,24	94,59	36	61,11
Supurativa+ Intersticial	2	0,00	50,00	100,00	2	50,00

n= número de animais. [1.] *Mycoplasma hyopneumoniae;* BALT – hiperplasia tecido linfoide associado aos brônquios e bronquíolos; * Pneumonia granulomatosa;
Fonte: produção do próprio autor, 2016.

5 DISCUSSÃO

A prevalência e prejuízos causados pelas pneumonias na suinocultura é um assunto conhecido de longa data e, embora seja muito discutido e com inúmeras pesquisas, ainda existe carência de informações. Nos últimos anos, principalmente, após aparecimento do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em suínos (SCHAEFER et al., 2011), quadros respiratórios mistos/complexos são cada vez mais frequentes, especialmente sob efeito de condições ambientais e de manejo deficientes. A vacinação é uma medida profilática amplamente utilizada e que apresenta bons resultados na prevenção e controle das doenças respiratórias, todavia, existem algumas ressalvas quanto ao seu uso especialmente para o FLUAV devido à diversidade genética do vírus e limitada resposta entre subtipos (KITIKOON et al., 2006; THACKER & JANKE, 2008; VINCENT et al., 2010; RAJÃO et al., 2013; RAJÃO et al., 2014b).

No presente estudo foi testada em suínos uma vacina inativada monovalente contendo como antígeno o vírus influenza A(H1N1)pdm09 e foram avaliados dois diferentes adjuvantes em protocolos vacinais com uma e duas doses. Com o objetivo estabelecer a duração da imunidade materna, evitando a interferência dos anticorpos maternos no estabelecimento de imunidade pós-vacinação (KITIKOON et al., 2006; RAJÃO et al., 2014b), soro colhido dos leitões antes do início do experimento foi testado pelo teste de ELISA-NP. Anticorpos maternos contra o FLUAV foram identificados no soro, em média por até 35 dias, sendo que, os leitões eram negativos para o FLUAV aos 55 dias de idade. Como não houve monitoria no período entre 35 e 55 dias não foi possível precisar em que momento os animais soronegativaram, todavia, este intervalo de tempo está de acordo com o descrito por Van Reeth; Brown; Olsen (2012), que citam a persistência dos anticorpos maternos até a sexta semana de vida (42 dias de idade) em rebanhos não vacinados.

Para avaliar a efetividade da vacinação em induzir a produção de anticorpos para o FLUAV, os soros dos suínos foram testados por ELISA – NP e HI. O grupo que apresentou o maior número de suínos soropositivos para FLUAV testados, 21 dias após a segunda dose da vacinação foi o G2. A soroconversão observada no teste de ELISA – NP neste grupo (G2) foi confirmada pelo padrão-ouro, o teste de HI. A técnica de HI detecta anticorpos produzidos contra a hemaglutinina viral (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012), ou seja, a positividade se referiu a títulos de anticorpos específicos para o vírus homólogo ao da vacina. Diferenças na resposta imune detectada pelos dois testes utilizados (ELISA – NP – 23,6% e HI – 19,05%) na avaliação dos soros do G2 se deve a diferença na sensibilidade de cada teste (GOODELL et al., 2014).

Nos demais grupos vacinados (G3 e G4) não houve resposta imune humoral significativa, e o fato de os suínos do grupo controle (G1) não terem produzido anticorpos contra o FLUAV, nos garante que a resposta imune humoral do G2 se refere à imunização e não à infecção natural. Em relação ao uso do adjuvante água-em-óleo - Emulsigen - D, Souza et al. (2015) relatam boa resposta humoral induzida com a aplicação de vacinas com adjuvantes água em óleo, e, Galliher-Beckley et al. (2015) descrevem duração prolongada da resposta imune, de até quatro meses, após vacinação contra o FLUAV utilizando este mesmo tipo de adjuvante.

Ainda, a dose de antígeno viral (carga antigênica) utilizada e os adjuvantes empregados tem relação direta com a efetividade da vacinação (RAJÃO et al., 2014a; GALLIHER-BECKLEY et al., 2015; ZANELLA et al., 2015). De acordo com Galliher-Beckley et al. (2015) este tipo de adjuvante induz uma boa resposta humoral mesmo quando utilizada 50% da dose de antígeno vacinal. Os autores demonstram ainda bons resultados no uso deste tipo de adjuvante em temperaturas ambientais mais elevadas (até 40°C) por períodos prolongados. Souza et al. (2015) comentam como aspecto negativo do uso do adjuvante

água-em-óleo (Emulsigen-D®) a maior ocorrência de lesão pulmonar quando os suínos vacinados são desafiados com vírus heterólogo ao presente na vacina, sugerindo efeito do adjuvante na ocorrência da VAERD.

Embora o G2 tenha apresentado os melhores resultados, o número de animais que produziram anticorpos contra o FLUAV pós-vacinação não foi alto (HI – 19,05%). Entretanto, padrão semelhante é observado na vacinação de humanos para FLUAV, onde são detectados níveis de proteção variando entre 10 e 60% de acordo com a idade, e especialmente menor em crianças (CDC, 2015; DEL GIUDICE & RAPPUOLI, 2015). De acordo com Van Reeth; Brown; Olsen, (2012), anticorpos produzidos contra a proteína HA, detectados pelo teste de HI, são correlacionados com proteção contra a doença clínica. Porém, Galliher-Beckley et al. (2015) ressaltam que os títulos de HI nem sempre estão relacionados com proteção, necessitando de uma avaliação mais específica como a imunidade celular pós-vacinação, o que não foi avaliado no presente estudo.

Ao longo do experimento, apesar de não terem sido observados sinais clínicos sugestivos de infecção por FLUAV, sugere-se que o vírus tenha sido introduzido nos quatro grupos e circulado em pelo menos dois momentos. Esta observação é confirmada pela análise laboratorial das amostras colhidas de suínos, onde anticorpos contra o FLUAV foram detectados a partir dos 77 dias de idade e o FLUAV foi detectado por RT-PCR em tecido pulmonar colhido aos 70, 126 e 156 dias (abate) em poucas amostras (27/408) e com baixa carga viral. Além da detecção de anticorpos contra o FLUAV em leitões do grupo controle (G1), a soroconversão dos animais aos 98 dias, observado em todos os grupos, inclusive no grupo controle, indica infecção natural e circulação viral. Em resumo, os resultados encontrados sugerem que a resposta imune detectada em suínos do G2 foi devido à vacinação e que houve circulação viral no rebanho (em todos os grupos). Contudo, a infecção provavelmente ocorreu na forma subclínica.

A vacinação não garante a imunização dos suínos, embora, outros fatores incluindo características individuais e genéticas podem estar associados com a resposta imune pós-vacinação (ZANELLA et al., 2015). A vacinação tampouco impede a infecção pelo FLUAV e, após a vacinação, a duração da imunidade é de oito a 10 semanas (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). O objetivo da vacinação contra o vírus influenza é controlar a doença clínica e reduzir a excreção viral, desta forma reduzindo a circulação viral no rebanho ao longo do tempo. O protocolo de vacinação utilizado objetivou a proteção contra a doença clínica na fase de creche, momento em que os leitões são mais suscetíveis à infecção pelo FLUAV. No Brasil, segundo relato de Schaefer et al. (2011), durante surtos de infecção respiratória causada pelo FLUAV os leitões na fase de creche foram os mais acometidos, o que também é descrito por Watanabe et al. (2012).

A efetividade da vacinação pode ser avaliada de diferentes formas. Além do uso de técnicas sorológicas, uma forma é a avaliação de proteção clínica após o desafio dos suínos vacinados com FLUAV. Nos animais desafiados também é avaliado se houve redução da excreção viral. Entretanto, como a influenza é uma zoonose, no presente estudo não foi possível à realização de desafio dos suínos pela ausência de uma estrutura de biotério com biossegurança para a realização do mesmo. Devido à disseminação do vírus em aerossóis, há risco de infecção de tratadores e executores das atividades e dos animais. Entretanto, outros parâmetros foram medidos para testar a efetividade da vacina utilizada como, por exemplo, desempenho produtivo, frequência de lesões e detecção de patógenos. A vacinação dos suínos para FLUAV não influenciou positivamente os dados produtivos do rebanho, evidenciados pelas avaliações de consumo alimentar, ganho de peso e conversão alimentar em que os resultados não demonstraram diferença significativa ao final do trabalho.

Doença respiratória grave não foi observada nos suínos dos diferentes grupos. Eventualmente ocorriam espirros ou tosses, mas nunca na forma de surtos. Os espirros foram mais frequentes no início da fase de creche, o que pode estar relacionado às condições de ambiência devido ao agrupamento dos animais e a necessidade de se manter temperatura adequada na sala. No caso da terminação, a maior casuística foi de tosse. O aumento da concentração de partículas contaminantes (poeira, ração) no ambiente pode ser considerado um fator predisponente às infecções respiratórias (BOCHEV, 2007), porém, durante o manejo diário de ambiência as janelas e cortinas ficavam abertas de modo a permitir renovação do ar, sem incidência de correntes de ar sobre os animais.

Ainda, as temperaturas médias máximas e mínimas nas salas de terminação no período do experimento não apresentaram oscilações, sendo consideradas amenas para a estação. No inverno, não foram registradas temperaturas mínimas extremas, dessa forma, os fatores ambientais interferiram muito pouco na ocorrência de infecções respiratórias. Dubey; Venkatesh; Kullarni (2009) citam o inverno como período de maior probabilidade para ocorrência de surtos de influenza, ao contrário de De Corte et al. (2015) que ressaltam a possibilidade da infecção por FLUAV ocorrer em qualquer estação devido a capacidade do suíno em se infectar com mais de um subtipo viral.

Mesmo que discreto, o aumento da tosse na fase final da terminação possivelmente se deve a infecção pelo *M. hyopneumoniae* associado ao PCV2. Opriessnig et al. (2004) relatam diferentes apresentações clínicas pela inoculação de suínos com *M. hyopneumoniae* e PCV2, sendo os sinais clínicos considerados leves a moderados na infecção por *M. hyopneumoniae* e com ocorrência de sinais clínicos graves na infecção de *M. hyopneumoniae* associado ao PCV2. Morés et al. (2015) relacionam tosse com detecção de lesões no pulmão, neste caso, referente ao *M. hyopneumoniae*, o que também é

descrito por Sibila et al. (2012). A pouca ocorrência de tosse também tem relação com a baixa casuística de agentes secundários como a *P. multocida.*

Por ocasião da necropsia e abate as principais lesões observadas foram de consolidação vermelho-escura, firme, com localização crânio-ventral em lobos apicais e cardíacos. Nos animais necropsiados, os lobos cardíacos foram os mais acometidos, com pouco mais de 30% de lesão no lado esquerdo, o que corrobora com Fablet et al. (2012). As avaliações macroscópicas dos pulmões dos animais necropsiados, tanto na fase inicial do crescimento, quanto na metade da terminação, demonstraram menor prevalência de consolidação quando comparado ao observado no abate, onde os valores chegaram a 67,12%, porém sem diferença significativa do grupo. A literatura descreve valores variados de frequência de lesão, 55,7% (FRAILE et al., 2010), a extremos como 98,6% (MORÉS et al., 2015), ou, variações de 19% a 79% conforme relato de Fablet et al. (2012).

A lesão de consolidação vermelho-escura com distribuição crânio-ventral ocorre devido a atelectasia e é indicativa da presença de *M. hyopneumoniae* (PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009; HANSEN et al., 2010), contudo, também pode ser causada por FLUAV (SCHAEFER et al., 2011; GAUGER et al., 2012; WATANABE et al., 2012) e *P. multocida* (FRAILE et al., 2010; HANSEN et al., 2010; OLIVEIRA-FILHO et al., 2015). Diante disto, a simples observação macroscópica deste tipo de lesão é sugestiva de broncopneumonia, porém, para definir a etiologia é necessário o uso de metodologias complementares de diagnóstico.

A menor frequência de lesões de consolidação nos animais necropsiados, quando comparado aos animais do abate, é decorrente do maior desafio por *M. hyopneumoniae* se dar na fase final de terminação ao abate, uma vez que, a infecção é crônica (SARRADEL et al., 2003; SIBILA et al., 2007; REDONDO et al., 2009; FABLET et al., 2012). Esta relação de

maior ocorrência de lesões de broncopneumonia por ocasião do abate relacionadas ao *M. hyopneumoniae* é observado na histologia pela lesão característica de hiperplasia de BALT, e também pela detecção do agente no tecido pulmonar pela técnica de PCR (73,08% de pulmões com lesão de hiperplasia de BALT foram positivos na PCR para *M. hyopneumoniae*). Sibila et al. (2007) descrevem esta mesma relação de lesão e detecção do agente e Pieters et al. (2009) ressaltam que o agente pode permanecer nos tecidos por até 214 dias e a transmissão/eliminação foi relatada por até 200 dias pós-infecção.

Todos os grupos avaliados ao abate apresentaram lesões pulmonares significativas e com alta prevalência, segundo resultados do IPP para o G2 e G4 (PIFFER & BRITO, 1991). Em muitos casos, a área pulmonar média afetada em cada animal foi considerada baixa, mas no total, foi observado um grande número de animais apresentando lesões ao abate. Bochev (2008) relata que quando mais de 15% dos pulmões apresentam consolidação existe grande chance da ocorrência de pneumonia enzoótica, a qual está relacionada ao patógeno *M. hyopneumoniae.* Morés et al. (2015) relacionaram a presença de maior área pulmonar lesionada com o diagnóstico de *P. multocida*, porém, a detecção do agente neste estudo foi baixa.

Na condição dos animais, mesmo com inúmeras variáveis controladas como uniformidade dos grupos, temperatura e manejo em geral, incluindo limpeza e desinfecção, a ocorrência de áereas de consolidação pulmonar foi elevada. Isto esta relacionado à presença do *M. hyopneumoniae* que é um agente enzoótico nas granjas e tem como agravante o PCV2.

Outros patógenos detectados no tecido pulmonar dos suínos de todos os grupos foram o PCV2 e *M. hyopneumoniae* (Figura 7 e Tabela 12), apesar do protocolo profilático da granja incluir vacinação para estes dois agentes. A vacinação não garante a imunização e, principalmente, não impede a infecção, visto pela frequência de detecção dos dois agentes. A

identificação de amostras positivas para PCV2 pela técnica de PCR confirma a presença do vírus no rebanho, e, com diferença significativa no número de animais infectados entre grupos. No presente trabalho, os suínos que apresentaram melhor resposta humoral após a vacinação com FLUAV (G2) apresentaram menor positividade para o PCV2 (23,29% ao abate) em pulmão quando avaliados por PCR. O PCV2 é considerado um vírus ubíquo em rebanhos suínos no mundo inteiro, onde vários fatores de manejo, ambiência ou até mesmo a presença de co-infecções parece predispor à ocorrência das doenças associados ao PCV2 (FABLET et al., 2012; SEGALÉS, 2012). Cabe ressaltar que a simples detecção do PCV2 pela técnica de PCR não indica doença, apenas reflete infecção prévia. Nas avaliações de necropsia haviam lesões macroscópicas compatíveis com a presença do agente como aumento de linfonodos mesentéricos, todavia, não foi observada diferença de lesões características de PCV2 nos grupos e também não foi pesquisada/quantificada a presença do vírus no soro dos animais.

Em geral, na rotina de diagnóstico, a escolha de qual material deve ser colhido para análise histopatológica é baseada na observação macroscópica do tecido, sendo a porção de escolha, a que apresenta lesão macroscópica evidente. Todavia, por se tratar de uma condição experimental, todos os lobos pulmonares foram avaliados durante a necropsia, sendo colhidos para avaliação histopatológica tanto lobos normais quanto lobos pulmonares com consolidação. Esta conduta resultou na detecção de um número expressivo de amostras com lesões microscópicas (>60%) em lobos onde não havia lesão macroscópica evidente.

Uma das hipóteses para esta detecção na histopatologia, sem observação de lesão macroscópica, provavelmente se deve a fase de desenvolvimento da mesma, ou seja, lesão aguda (bem recente), ou, também pode ser continuidade das lesões de outros lobos. A partir disto, pode-se inferir que a lesão microscópica

resulta em lesão macroscópica mais tardiamente. Como os pulmões avaliados eram da fase de crescimento e terminação, possivelmente no momento do abate, a área pulmonar afetada seria mais extensa e visível macroscopicamente. Um fator negativo para esta premissa é que as lesões pulmonares podem acarretar em efeitos negativos para a saúde animal e em perdas de desempenho (FRAILE et al., 2010; THACKER & MINION, 2012).

Na histologia, a lesão mais frequentemente encontrada foi à hiperplasia de BALT associada à reação broncointersticial predominantemente mononuclear. Este padrão de lesão tem relação com *M. hyopneumoniae* (SARRADEL et al., 2003; PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009) e está de acordo com os achados de Morés et al. (2015). Redondo et al. (2009) relatam no início da infecção por *M. hyopneumoniae* (7 a 28 dias) pneumonia broncointersticial acompanhada de perda de cílios e descamação de células epiteliais nas vias aéreas. Após os 28 dias da infecção, a hiperplasia de BALT é mais severa indicando cronicidade.

Em todas as amostras não foram observadas lesões características da infecção pelo FLUAV, tampouco, houve marcação do antígeno viral por IHQ. Morés et al. (2015) detectaram antígeno de FLUAV pela técnica de IHQ somente na bronquiolite necrótica que é característica do agente. Jung & Chae (2005) em surto de H1N2 relatam pneumonia broncointersticial associada à exsudato em brônquios e bronquíolos e debris celulares. No caso dos animais do experimento, a pneumonia broncointersticial observada é uma condição mais crônica característica da infecção por *M. hyopneumoniae* e, não se observou debris necróticos ou necrose, que seria característico da infecção pelo FLUAV. A literatura relaciona a lesão broncointersticial com a detecção do *M. hyopneumoniae* por PCR (CALSAMIGLIA; COLLINS; PIJOAN, 2000; SARRADELL et al., 2003; SIBILA et al., 2007;

PIETERS et al., 2009), o que também foi observado nos animais do experimento.

Diferença significativa ocorreu entre os grupos analisados quanto à detecção da hiperplasia de BALT e se observou maior ocorrência desta relacionada aos grupos vacinados. Ainda, foi possível relacionar a gravidade das lesões com a detecção do agente. Quanto mais grave a lesão de hiperplasia de BALT, maior foi à detecção do material genético bacteriano o que também é relatado por Calsamiglia; Collins; Pijoan, (2000); Sarradel et al. (2003) e Morés et al. (2015).

O acúmulo linfoide ocorre devido à persistência do agente no tecido, induzindo uma resposta crônica com obliteração do lúmen de brônquios e bronquíolos e atelectasia de alvéolos. Esta atelectasia é decorrente da perda de função mucociliar permitindo acúmulo de muco/exsudato, aumento na atividade de células secretórias, broncoconstrição por células de defesa e pressão dos agregados linfóides (SARRADEL et al., 2003). Esta persistência do *M. hyopneumoniae* no tecido explica a maior detecção por PCR em tecidos com lesão, tanto em animais vacinados como nos controles, e, o acúmulo de muco/exsudato pode ser um fator que predispõe a multiplicação bacteriana oportunista. A detecção do *M. hyopneumoniae* em pulmões sem lesão histológica pode ocorrer devido ao tempo de infecção, podendo ser lesão muito recente ou tardia, já em recuperação. Outra possibilidade é que a amostra colhida para exame histopatológico não foi representativa, observação similar ao relatado por Calsamiglia; Collins; Pijoan (2000).

Não houve marcação do antígeno de FLUAV por IHQ, isto ocorreu pela cronicidade das lesões se comparado ao momento da infecção. Lyoo et al. (2014) observaram que as lesões de FLUAV no tecido pulmonar ocorrem até 14 dias após a inoculação e o fato de não haver marcação viral na IHQ é sustentado pelos relatos de Watanabe et al. (2012) que detectaram FLUAV por IHQ em apenas 50% dos casos de pneumonia viral. Cabe ressaltar que em casos de infecção

natural, a colheita das amostras é realizada de suínos com doença clínica, possivelmente excretando o vírus pelas vias respiratórias, aumentado às chances de detecção do FLUAV pelas técnicas disponíveis (CULHAME & DETMER 2014; LANGE et al., 2009). Neira et al. (2016) relatam a detecção do FLUAV no ar por até 11 dias em surtos, e, Dubey; Venkatesh; Kulkarni (2009) citam possível estado portador de alguns animais por até três meses.

O aumento de lesão pulmonar nos animais vacinados quando comparados aos controles pode ser referente à VAERD, todavia para se estabelecer esta relação deveria ter sido realizado o sequenciamento da amostra de FLUAV que circulou na granja, o qual deveria ser de um subtipo diferente daquele da vacina e deveria haver identificação de lesões compatíveis com infecção por FLUAV. Estas lesões segundo Gauger et al. (2012) se caracterizam por pneumonia broncointersticial severa e bronquiolite necrótica com edema e hemorragia alveolar, o que não foi o caso, pois as lesões observadas nos animais do experimento eram predominantemente de infecção crônica por *M. hyopneumoniae.*

A marcação para *M. hyopneumoniae* por IHQ foi discreta em todos os casos e ocorreu predominantemente em cílios. Em algumas amostras ocorreu marcação no exsudato e em células descamadas na luz de brônquios e bronquíolos, o que também é descrito por Sarradel et al. (2003); Pieters et al. (2009) e Redondo et al. (2009). Houve dificuldade na observação da marcação em tecido colhido de animais abatidos, provavelmente pela demora na avaliação, uma vez que os pulmões foram colhidos na linha de inspeção, acondicionados em caixas isotérmicas e avaliados no laboratório de patologia. Em muitos casos ocorreu perda de cílios e degradação do epitélio de brônquios e bronquíolos, o que pode estar relacionado ao tempo da avaliação e também, pelo processo de escaldagem durante o abate. A opção e recomendação de colheita deste tipo de material

para diagnóstico definitivo de *M. hyopneumoniae* precisa ser melhor avaliado.

Para Sarradel et al. (2003) lesões que acometem os alvéolos não tem relação direta com *M. hyopneumoniae*, mas sim são lesões secundárias ou decorrentes de infecção por agentes secundários, caracterizando os quadros como complexos. Independente da macroscopia, amostras que apresentavam infiltração de macrófagos e neutrófilos (broncopneumonia supurativa e catarral) na histopatologia foram testadas por PCR para detecção de *P. multocida*, sendo que 8,66% das amostras testadas foram positivas para o agente. Choi et al. (2003) relatam uma frequência maior em casos de PRDC. A escolha das amostras com broncopneumonia catarral e supurativa para pesquisa de *P. multocida* se refere ao tipo de lesão característico da bactéria conforme Hansen et al. (2010) e devido a maior probabilidade da detecção do agente em tecidos com lesão, segundo afirma Moraes et al. (2014).

A baixa detecção da *P. multocida* em suínos com lesão pode estar relacionada à ausência do agente, ou seja, não é um agente de importância naquelas lesões, podendo ter relação com outros agentes como o *M. hyopneumoniae*. Embora, Hansen et al. (2010) relacionam a *P. multocida* com casos de broncopneumonia supurativas aguda e subaguda, e, broncopneumonia crônica não supurativa, Oliveira Filho et al. (2015) afirmam que o agente induz resposta com intensa infiltração de neutrófilos e a presença deste tipo de célula pode estar relacionada também a uma condição de inflamação aguda, ocasionada até mesmo por *M. hyopneumoniae*. De acordo com Redondo et al. (2009) neutrófilos e edema são observados nas infecções mais iniciais por *M. hyopneumoniae*. Nos casos em que a *P. multocida* foi detectada, a maior frequência se deu em casos supurativos e pode estar relacionada como agente secundário o que está de acordo com Hansen et al. (2010) e Schimidt et al. (2015).

A detecção de amostras positivas para PCV2 pela técnica de PCR confirma a presença do vírus no rebanho. Como o vírus é considerado ubíquo em rebanhos suínos de acordo com Segalés, Allan & Domingo (2012), para caracterizar um quadro clínico de circovirose é necessário associar a lesão microscópica em tecido linfoide com a detecção do PCV2 nestas lesões. Além disso, a alta carga viral precisa ser detectada por PCR em tempo real nos tecidos afetados (SEGALÉS, 2012). As lesões descritas como características do quadro respiratório ocasionado pelo PCV2 como pneumonia broncointersticial com fibrose peribronquial e peribronquiolar e espessamento de septos alveolares com infiltrado de linfócitos e histiócitos (HARMS et al., 2002; KING; CHUNG; CHAE, 2008), no presente trabalho raramente foram observadas.

Durante as necropsias foram observadas lesões extra-pulmonares, sendo uma das mais comuns a linfoadenopatia de mesentéricos e inguinais. Estas lesões são frequentemente relacionadas à presença do PCV2 (KIM; CHUNG; CHAE, 2003; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). O fato do vírus circular no rebanho é uma condição muito frequente e, a observação da lesão juntamente com o resultado da PCR pode ser sugestivo, necessitando, para confirmação, do exame IHQ dos linfonodos. No entanto, o objetivo não foi avaliar a presença do agente em sítios não respiratórios, ou seja, a doença sistêmica, mas sim, a relação do agente com quadro pulmonar.

Poucas amostras apresentaram pneumonia granulomatosa e todos os animais que apresentaram esta lesão foram diagnosticados por ocasião do abate, denotando cronicidade. Nessas amostras foram observadas células gigantes do tipo corpo estranho, cuja causa provável é a aspiração de partículas de ração. Pela técnica de coloração especial por PAS e Groccot não foram observadas hifas fúngicas e na histologia foi possível observar estruturas amorfas em bronquíolos e alvéolos, algumas já em processo de fagocitose.

Tendo identificado no rebanho os agentes bacterianos *M. hyopneumoniae* e *P. multocida* e virais (PCV2, FLUAV) foi possível avaliar a interação entre eles, embora seja evidente a presença do *M. hyopneumoniae* como agente mais frequente o que também é descrito por diversos autores (PALZER et al., 2008; FRAILE et al., 2010; HANSEN et al., 2010; FABLET et al., 2012). No que se refere à interação de patógenos, agindo em associação, os mais frequentemente detectados foram *M. hyopneumoniae* e PCV2 (23%). Harms et al. (2002) também relatam a associação do PCV2 com *M. hyopneumoniae* (19%). Sibila et al. (2012) testaram a infecção simultânea de suínos com *M. hyopneumoniae* e PCV2 e observaram a ocorrência de lesões pulmonares ao mesmo tempo em que se estabelecia uma infecção subclínica pelo PCV2. Já na infecção de PCV2 em leitões previamente infectados pelo *M. hyopneumoniae,* Oppriesnig et al. (2004) relatam sinais clínicos mais graves e maior detecção de antígenos de PCV2, possivelmente devido a predisposição do *M. hyopneumoniae*.

No presente estudo a detecção do FLUAV foi baixa (2%) e muito mais frequentemente associada a outros agentes. Isto demonstra que o vírus atua mais comumente em conjunto com outros patógenos que isolado. Harms et al. (2002) relatam a associação do FLUAV com PCV2 (12 % dos casos). No presente estudo, o PCV2 também teve maior importância associado a outros patógenos do que isolado, o que está de acordo com Pallares et al. (2002). Kim, Chung, Chae (2003) encontraram infecções mistas de PCV2 com bactérias. Pallares et al. (2002) em casos de doença sistêmica ocasionada por PCV2 identificaram como agentes frequentes o PRRSV e *M. hyopneumoniae*. No caso do PRRSV não foi avaliado, pois não há relatos do vírus no Brasil. Tanto Harms et al. (2002) como Pallares et al. (2002) evidenciaram que em condições de campo, os vírus influenza e PCV2 atuam em sinergismo, podendo ser identificados em um mesmo suíno com PRDC. Nos animais avaliados a ocorrência de PCV2 e FLUAV foi de 1% reforçando

mais uma vez que estes agentes têm maior importância se associados ao *M. hyopneumoniae*.

A associação do *M. hyopneumoniae* com FLUAV e *M. hyorhinis* detectados pela PCR e a correlação na detecção de *M. hyopneumoniae* e *P. multocida* é citada por Palzer et al. (2008). O fato do *M. hyopneumoniae* ter sido o agente predominante nos pulmões avaliados deve-se atentar ao seu papel em predispor a colonização de agentes secundários, o que ficou evidente pelos achados de co-infecções. Esta mesma relação é descrita por Calsamiglia; Collins; Pijoan, (2000) e Palzer et al. (2008).

Como em geral as avaliações acontecem por ocasião da morte ou no abate, a detecção de mais de um patógeno é frequente, ou seja, infecção mista (HANSEN et al., 2010). Palzer et al. (2008) destacam que muitas avaliações patológicas acontecem em animais já tratados, o que dificulta diagnóstico, por estes motivos, deve-se ter preocupação no estabelecimento de um diagnóstico completo (KIM; CHUNG; CHAE, 2003). No presente estudo, os resultados demonstram que mesmo em suínos vacinados (FLUAV, PCV2 e *M. hyopneumoniae*) e mantidos em boas condições ambientais e de manejo controlado, a ocorrência de lesões e detecção de agentes em associação (infecções mistas) foi alta, o que torna evidente a frequência e complexidade das pneumonias em suínos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A vacinação para FLUAV em suínos mostrou-se mais efetiva na indução da imunidade humoral quando associada ao adjuvante Emulsigen - D®, e utilizada em protocolo de duas doses.

- A partir da avaliação dos dados de desempenho e clínicos é possível inferir que a vacinação para FLUAV não interfere nos índices de desempenho dos suínos.

- A vacinação para FLUAV não diminuiu a ocorrência de agentes associados nem as lesões pulmonares compatíveis com pneumonia.

- A partir dos achados é perceptível que o PRDC prevalece nos rebanhos de suínos e que o principal agente envolvido é o *M. hyopneumoniae* mesmo em boas condições de ambiência e manejo.

- O *M. hyopneumoniae* atua como agente predisponente para pneumonias que mais tarde resultam em casos complicados por agentes oportunistas evidenciado pelas combinações de patógenos e lesões.

- As lesões mais frequentes foram características de pneumonia bacteriana crônica compatível com identificação do *M. hyopneumoniae* sem indícios do envolvimento viral.

- A maior frequência de lesões no grupo que obteve a melhor resposta humoral frente a vacinação (G2) pode ter relação com adjuvante, e, possível VAERD, porém para confirmação é necessária uma investigação mais detalhada, incluindo sequenciamento viral.

- A monitoria de abate é uma ferramenta importante para diagnóstico de lesões e permite a avaliação de um maior número de animais, todavia, não a colheita de material para diagnóstico laboratorial por ocasião do abate precisa ser melhor avaliada, uma vez que, ocorre degradação de estruturas teciduais.

- Os lobos mais comumente afetados por consolidação foram os cardíacos e a observação macroscópica do pulmão não necessariamente tem associação com a microscopia, sendo possível detectar lesões histológicas em lobos aparentemente sadios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDO, N et al. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza vírus. **Veterinary Microbiology**, n.168, p.34-40, 2014.

BOCHEV I. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review: I Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p.131-146, 2007.

BOCHEV, I. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review: II. Diagnostics, treatment and prevention. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.11, n.4, p. 219-234, 2008.

BRENTANO, L et al. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Comunicado técnico** Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC, n. 306, p. 1-6. 2002.

BROWN, I.H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**. v.74, p.29-46. 2000.

CALSAMIGLIA, M.; COLLINS, J.E.; PIJOAN, C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.299-303, 2000.

CARON, L.F et al. Seroprevalence of H3N2 influenza A virus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. **Virus Reviews and Research**. v. 15, p.63-73. 2010.

CASTRO, L.A et al. Monospecific polyclonal antibodies for immunodetection os *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine pneumonic lungs. **Veterinary Immunologic and Immunopathology**, v.128, p.336-337, 2009.

CDC – Centers for disease control and prevention. United States of America. 2015. <http://www.cdc.gov/media/releases/2015/s0226-acip.html> Acesso em: 09 fev. 2016.

CHEN, Q et al. Vaccine development for protecting swine against influenza virus. **Animal Health Research Reviews**, v.13, n.2, p.181-195. 2012.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.5, p.522-527, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pigs using a commercial influenza epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay developed for avian species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22. p.3-9, 2010.

CIACCI-ZANELLA, J.R et al. Current and retrospective serology study of influenza a viruses antibodies in Brazilian pig populations. In: **Proceedings** of 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. Barcelona, p. 261-261. 2011.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Influenza Avirus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. **Veterinary Microbiology**, v. 22, n.180, p. 118-122. 2015.

CINO-OZUNA, A.G et al. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.5, p.2012-2016, 2011.

CIPRIAN, A et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Jornal of Veterinary Medicine**, n.52, p.434-438,1988.

CULHANE, M.R.; DETMER, S.E. Sample Types, Collection, and Transport for Influenza A Viruses of Swine. In: Erica Spackman (ed.). **Animal Influenza Virus Methods in Molecular Biology**, vol. 1161, p.259-263. 2014.

DEBLANC, C et al. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European

swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1-2, p. 96-105, 2012.

DECORTE, I et al. Detection and isolation of swine influenza a virus in spiked oral fluid and samples from individually housed, experimentally infected pigs: Potential Role of Porcine Oral Fluid in Active Influenza A Virus Surveillance in Swine. **PLoS ONE,** v.10, n.10, e0139586, 2015.

DEL GIUDICE G.; RAPPUOLI R. Inactivated and Adjuvanted Influenza Vaccines. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 386, p.151-180, 2014.

DUBEY, S.C.; VENKATESH, G.; KULKARNI, D.D. Epidemiological update on swine influenza (H1N1) in pigs. **Indian Journal Microbiology**, v. 49, p.324-331. 2009.

FABLET, C et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n.2, p.627-630, 2012.

FACHINGER, V et al. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. **Vaccine**, v. 26, p.1488-1499, 2008.

FRAILE L et al. Risk factors associated with pleuritic and cranioventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. **Veterinary Journal**, v. 184, p.326-333, 2010.

GALLIHER-BECKLEY, A et al. Characterization of a novel oil-in-water emulsion adjuvant for swine influenza virus and Mycoplasma hyopneumoniae vaccines. **Vaccine,** v. 33, p.2903-2908. 2015.

GAUGER, P.C et al. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (delta-cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009H1N1 influenza virus. **Vaccine**, v. 29, n.15, p.2712-2719, 2011.

GAUGER, P.C et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. **Veterinary Pathology**, v. 49, n.6, p.900-912, 2012.

GAVA, D et al. Padronização de uma Técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) em Cortes Histológicos para a Detecção de Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV-2) Utilizando Anticorpo Monoclonal. *In*: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, Fortaleza, CE. **Anais**...Fortaleza/CE: Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos, p.113-114, 2005.

GILLESPIE, J et al. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p.1151–1163. 2009.

GOODELL, C.K et al. Evaluation of screening assays for the detection of influenza A Virus serum antibodies in swine. **Transboundary and Emerging Diseases**.v. 63, p.24-35, 2014.

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

HARMS P.A et al. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. **Journal of Swine Health and Production**, n.10, p.27-30, 2002.

HOFFMANN, E et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, p.2275-2289, 2001.

JANKE. B. Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and Diagnosis. **Veterinary Pathology**, v. 51, n.2, p.410-426, 2014.

KICH, J.D et al. *Pasteurella multocida* tipo a atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? **Comunicado técnico**. Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, n. 469, 7. 2007.

KIM, J; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalina-fixed paraffin-embedded tissue using nested polimerase chain reaction and comparasion of nested PCR with in situ hybridization. **Journal of Virological Methods**, v. 92, p.105-111, 2001.

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

KITIKOON, P et al. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 112, p.117-128, 2006.

KITIKOON P et al. Vaccine efficacy and immune response to swine influenza virus challenge in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the time of SIV vaccination. **Veterinary Microbiology**. n. 139, p.235-244, 2009.

KITIKOON, P et al. Pathogenicity and Transmission in Pigs of the Novel A(H3N2) Influenza Virus Isolated from Humans and Characterization of Swine H3N2 Viruses Isolated in 2010-2011. **Journal of Virology**, v. 68, n.12, p. 6804–6814, 2012.

LANGE, E et al. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. **The Journal of General Virology**. v. 90, p.2119-2123. 2009.

LÓPEZ, A. Respiratory System. In: McGavin, M.D., Zachary, J.F, **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. Mosby Elsevier. 2006. cap 9. p.463-558, 2006.

LORUSSO, A et al. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. **Journal of Virological Methods**, v. 164, p.83-87, 2010.

LOVING, C. L et al. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. **Microbiology Pathogens**, n. 49, p. 237-245, 2010.

LYOO, K et al. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenzaA vruses. **Virology Journal**, v. 11, n.170, p.1-6, 2014.

MADEC, F.; KOLBISCH, M. Bilan lesionnel des poumons de porcs charcutiers a l'abattoir. **Journées de la Recherche Porcine**, v. 14, p.8. 1982.

MAROIS C et al. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**. n. 135, p.283-291, 2008.

MORAES, D.F.S.D et al. Ocorrência de genes tad associados a formaao de biofilme em isolados de pasteurella multocida de pulmões de suínos com pneumonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1147-1152. 2014.

MORÉS, M.A.Z et al. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. **Anais**... *In*: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2011, Fortaleza, CE. Anais...Fortaleza/CE: Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos,CD-ROM, 2011.

MORÉS, M.A.Z et al. Orientações para Eutanásia de Suínos em Granjas pelo Método de Eletrocussão. **Documentos**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia SC, n. 164, 22 p. 2014.

MORÉS, M.A.Z et al. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 725-733, 2015.

MORÉS, N et al. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos.** Goiânia: ed Cânone, 2. ed., p. 273-287, 2012.

NEIRA, V et al. Characterization of viral load, viability and persistence of influenza A vírus in air ando n surfaces of swine production facilities. **PlosOne**, v. 11, n.1, p.1-16, 2016.

OLIVEIRA-FILHO, J.X et al. *Pasteurella multocida* type A as the primary agente of pneumonia and septicemia in pigs. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**. v. 35, n.8, p. 716-724, 2015.

OPRIESSNIG, T et al. Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Dual

Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. **Veterinary Pathology**. v. 41, p.624-640, 2004.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X-J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2–associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. **Virus Research**, v. 164, p.20-32, 2012.

OTAGIRI, Y et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n.8, p.801-805, 2005.

PAIXÃO, T.A et al. Enfermidades pelo gênero *Salmonella*. In: MEGID, J.; RIVEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 45, p.478-493. 2016.

PALADINO, E.S et al. Profile of porcine respiratory disease complex associated with *Pasteurella multocida* in Minas Gerais state, Brazil. **Proceedings**. In.: Proceeding 22nd International Pig Veterinary Society Congress, Korea, 2012. CD-ROM, BP-406, p.763, 2012.

PALLARÉS, F. J et al. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation,** v. 14, p.515-519, 2002.

PALZER, A et al. Association between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. **Veterinary Record**. v. 162, p.267-271. 2008.

PEDERSEN, J.C. Hemagglutination-Inhibition Assay for Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to Infleunza Virus. In: SPACKMAN, E. (Ed). **Animal Influenza Virus, Methods in Molecular Biology**, 2nd ed. chapter 2, v. 1161, p. 11-25, Human press, 2014.

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

PIFFER, I.A.; BRITO, J.R.F. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. **Documentos**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia SC, n.23, 16p. 1991.

PROPHET, E.B et al. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 279p, 1992.

RAITH, J et al. Influence os porcine circovirus type 2 vaccination on the probability and severity of pneumonia detected postmortem. **Veterinary Record**, v. 176, n, 124, 2015.

RAJÃO, D.S et al. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus in Brazilian pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p.30-36, 2013.

RAJÃO, D.S et al. Influenza A virus hemagglutinin protein subunit vaccine elicits vaccine-associated enhanced respiratory disease in pigs. **Vaccine**, v. 32, p.5170-5176, 2014a.

RAJÃO, D.S et al. Pathogenesis and Vaccination of Influenza A Virus in Swine. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 385, p. 307-326, 2014b.

RAPP-GABRIELSON, V.J.; OLIVEIRA, S.; PIJOAN C. *Haemophilus parasuis*. In: Straw, B.E. Zimmerman. J.J.; D'Allaire S.; Taylor, D.J. **Diseases of Swine**. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. cap. 40, p. 681-690, 2006.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimation of 50% endpoints. **American Journal of Hygiene**. v. 27, p.493-497, 1938.

ROMAGOSA, A et al. Vaccination of influenza a virus decreases transmission rates in pigs. **Veterinary Research**, v. 42, n.120, p.1-15, 2011.

ROSTAGNO, H.S et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos** – composição de alimentos e exigências nutricionais. 2. Ed. Viçosa: UFV, 186 p, 2005.

SANDBULTE, M.R et al. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine, **Vaccines,** v. 3, n.1, 22-73, 2015.

SARRADELL, J et al. A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus-associated Lymphoid Tissue of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Pathology**, v. 40, p.395–404, 2003.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows, Release 9.4, Cary, NC, USA, 2002-2012. CD-ROM.

SCHAEFER, R; TREVISOL, I. M.; PALUDO, E. Avaliação da presença do vírus influenza em suínos no Sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (Embrapa Suínos e Aves), p.1-18. 2008.

SCHAEFER, R et al. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 31, p.761-767. 2011.

SCHAEFER, R et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n.33, v. 1, p.61-73, 2013.

SCHAEFER, R et al. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. **Archives of Virology**. v. 160, n.1, p.29-38. 2015.

SCHMIDT, C et al. Swine Influenza Virus and Association with the Porcine Respiratory Disease Complex in Pig Farms in Southern Brazil. **Zoonoses and Public Health.** v. 63, p.234-240. 2015.

SEGALÉS, J et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**. v. 162, n.26, p. 867-868, 2008.

SÉGALES, J et al. **Diseases of Swine**. 10th ed. Wiley-Blackewll Publishing Ltda. Cap 26. p. 405-417, 2012.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research.** v. 164, n.1-2, p.10-19. 2012.

SEO, H.W et al. Interaction of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines on dually infected pigs. **Vaccine**. v. 32, p.2480-2486, 2014.

SHIBATA I et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and faeces from experimentally infected pigs and field cases. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 65, n.3, p.405-408, 2003.

SIBILA, M et al. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 122, p.97-107, 2007.

SIBILA, M et al. Simultaneous porcine circoviurs type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. **Journal of Comparative Pathology,** v. 147, np. 285-295, 2012.

SIMIONATTO, S.AB et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3-4, p.234-242, 2013.

SONCINI R.A.; MADUREIRA JÚNIOR S.E. **Monitorias sanitárias**. In: SOBESTIANSKY J., WENTZ I., SILVEIRA P.R.S. & SESTI L.A.C. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. Brasília: Embrapa-SPI, p. 91-110. 1998.

SOUZA, C.K et al. The impact of adjuvant in whole inactivated virus vaccines on vaccine-associated enhanced respiratory disease in pigs following influenza a virus challenge. In: 3rd International Symposium on Neglected Influenza Viruses, Georgia, U.S.A. **Proceedings.** 2015.

THACKER, E.L.; THACKER, B.J.; JANKE, B.H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2525-2530, 2001.

THACKER, E.L; JANKE, B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. **Journal of Infectious Diseases,** v. 197, p.19-24, 2008.

THACKER, E.L et al. **Diseases of Swine**. 10th ed. Wiley-Blackewll Publishing Ltda. 2012. Cap 57. p.779-798, 2012.

TOWSEND, K.M et al. Genetic Organization of Pasteurella multocida cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.924-929, 2001.

VAN REETH, K et al. Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002-2003. **Influenza and Other Respiratory Viruses**. v. 2, p 99-105. 2008.

VAN REETH, K et al. **Diseases of Swine**. 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing Ltda. 2012. Cap.40, p. 557-571, 2012.

VIDIGAL, P.M.P et al. Tipping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. **Virus Research**, v. 163, p.320-327, 2012.

VINCENT, L.L.; JANKE, B.H.; PAUL, P.S. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection

of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9. p.191-195, 1997.

VINCENT, A.L et al. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 4, n.2, p.53-60, 2010.

VINCENT, A.L et al. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. **Journal of Virology**, v. 86, n.19, p.10597-10605. 2012.

VINCENT, A.L.; LAGER, K.M.; ANDERSON, T.V. **A Brief Introduction to Influenza A Virus in Swine.** In: SPACKMAN, E. (ed.), Animal Influenza Virus, Methods in Molecular Biology, v. 1161, p.243-258. 2014.

WATANABE, T.N.T et al. Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza A infection in Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.11, p.1148-1154, 2012.

WILSON, S et al. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated Mycoplasma hyopneumoniae vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. **Vaccine**, v. 30, p.7625-7629. 2012.

XAVIER, L.H. **Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação**. Piracicaba, 2000. 91 p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2000.

YAZAWA S et al. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**. n. 98, p. 221-228, 2004.

YOON, S.W.; WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 385, p.359-375, 2014.

ZANELLA, R et al. Unravelling the genetic components involved in the immuneresponse of pigs vaccinated against influenza virus. **Virus Research**, v. 210, p.327–336. 2015.

ZHANG, J. & HARMON, K.M. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. **Methods Molecular Biology**, v. 1161, p.277-293, 2014.