

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DA PARIÇÃO SEGREGADA SOBRE A DINÂMICA DE
INFECÇÃO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E A OCORRÊNCIA DE LESÕES
PULMONARES AO ABATE**

RICARDO AUGUSTO NEVES FORNER

PORTO ALEGRE – RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INFLUÊNCIA DA PARIÇÃO SEGREGADA SOBRE A DINÂMICA DE INFECÇÃO
DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E A OCORRÊNCIA DE LESÕES PULMONARES
AO ABATE

Autor: Ricardo Augusto Neves Forner

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Suína.

Orientador: David Emilio Santos Neves de Barcellos

Coorientadores: Fernando Pandolfo Bortolozzo e Karine Ludwig Takeuti

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Neves Forner, Ricardo Augusto
INFLUÊNCIA DA PARIÇÃO SEGREGADA SOBRE A DINÂMICA DE
INFECÇÃO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E A OCORRÊNCIA DE
LESÕES PULMONARES AO ABATE / Ricardo Augusto Neves
Forner. -- 2020.
64 f.

Orientador: David Emílio Santos Neves de Barcellos.

Coorientadores: Karine Ludwig Takeuti, Fernando
Pandolfo Bortolozzo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Pneumonia enzoótica. 2. leitões. 3. ordem de
parto. 4. lesões pulmonares. I. Santos Neves de
Barcellos, David Emílio, orient. II. Ludwig Takeuti,
Karine, coorient. III. Pandolfo Bortolozzo, Fernando,
coorient. IV. Título.

Ricardo Augusto Neves Forner

INFLUÊNCIA DA SEGREGAÇÃO DE PARTOS SOBRE A DINÂMICA DE
INFECÇÃO DE *Mycoplasma hyopneumoniae* E A OCORRÊNCIA DE LESÕES
PULMONARES AO ABATE

Aprovado em 13 de fevereiro de 2020.

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

Orientador e Presidente da Comissão

Prof.^a Dr.^a Franciele Maboni Siqueira

Membro da Comissão

Dr. Lucas Fernando dos Santos

Membro da Comissão

Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar-me nesta trajetória que é a vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Aos meus Pais, Gilmar e Roseli, por todo apoio, motivação e amor, à minha irmã Elisandra pelo companheirismo e aos demais familiares.

À Monalisa, minha namorada e companheira, pelo amor e carinho, por me incentivar a ser uma pessoa melhor, pelos conselhos e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Professor David Barcellos, pelos ensinamentos e conselhos, pelo exemplo de humildade e simpatia. À coorientadora Dra. Karine Takeuti e ao coorientador Professor Fernando Bortolozzo, por todo o conhecimento passado, conselhos e por serem exemplos de profissionais.

Aos professores Rafael Ulguim e Ana Paula Mellagi do Setor de Suínos, e aos demais professores da UFRGS pelo imenso aprendizado.

Aos colegas da pós-graduação e estagiários que passaram pelo Setor de Suínos nesses dois anos pelo companheirismo, auxílio e aprendizado, em especial aos que ajudaram na realização do projeto: Elisa, Angela, Gabriela, Danielle, Daniela, Fernanda, Willian, Leonardo e Anne.

À empresa Master Agroindustrial por ceder as granjas e os animais para a realização do projeto, em especial à Mônica Santi por todo o suporte oferecido e aos colaboradores das granjas e do frigorífico da empresa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias e à UFRGS pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos laboratórios de Patologia Veterinária e Virologia Veterinária, por cederem os equipamentos e pelo suporte técnico.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao FUNDESA pelo suporte financeiro para a realização do projeto.

A todos meu sincero Muito Obrigado!

RESUMO

As leitoas consistem em um grupo de risco na transmissão vertical de *Mycoplasma hyopneumoniae* dentro do sistema de produção de suínos. Dessa forma, a segregação de partos poderia ser utilizada como alternativa para controlar as infecções por *M. hyopneumoniae*. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da segregação de partos sobre a dinâmica de infecção de *M. hyopneumoniae* e a ocorrência e severidade das lesões pulmonares ao abate. Para isso três sistemas de produção de suínos com três sítios cada foram incluídos no estudo. A granja A consistia da unidade onde as leitoas tem o primeiro parto, ou seja, alojava somente de fêmeas de ordem de parto 1 (Granja OP1). Após o primeiro parto as fêmeas OP1 foram transferidas para a granja B (Granja OP2-6), ou seja, consistia de fêmeas de ordem de parto 2 a 6, e a granja C consistiu em uma granja convencional com reposição de leitoas (Granja OP1-6), com fêmeas de ordem de parto 1 a 6. Os leitões nascidos de cada granja foram transferidos e criados em creches e terminações segregadas. As matrizes de todas as granjas do estudo foram amostradas previamente ao parto e os leitões foram amostrados longitudinalmente aos 21, 63, 100 e 140 dias de idade e ao abate. Em todos os momentos de coleta, as amostras foram avaliadas por PCR para detecção de *M. hyopneumoniae*. As lesões pulmonares foram avaliadas e escores de lesão foram atribuídos ao abate. A prevalência de matrizes positivas para *M. hyopneumoniae* não diferiu entre as granjas ($p > 0,05$). A prevalência ao desmame foi maior na granja A (OP1) ($p < 0,05$). No entanto, dos 100 dias de idade até o abate a prevalência de leitões positivos para *M. hyopneumoniae* foi maior na granja B (OP2-6) ($p < 0,05$), onde também se observou maior ocorrência e severidade de lesões pulmonares quando comparada às outras duas granjas ($p < 0,05$). Apesar de os resultados sugerirem que não exista um benefício da segregação de partos no controle da infecção por *M. hyopneumoniae*, é possível que a associação da aclimatação de leitoas previamente à entrada nas granjas de destino e o uso da segregação de partos poderia ser vantajosa.

Palavras-chave: Pneumonia enzoótica, leitoas, ordem de parto, lesões pulmonares.

ABSTRACT

Gilts are a group risk for Mycoplasma hyopneumoniae vertical transmission in swine herds. Therefore, parity segregation could be used as an alternative to control M. hyopneumoniae infection. The aim of the study was to evaluate the effect of parity segregation on M. hyopneumoniae infection dynamics and occurrence and severity of lung lesions at slaughter. For that three herds with three sites each were included in the study. Herd A consisted of the herd where gilts would have their first farrowing (PO1 herd). After the first farrowing PO1 sows were transferred to herd B (PO2-6 herd). Herd C was a conventional herd with gilt replacement (PO1-6 herd). Piglets born in each herd were raised in separate nursery and finishing units. Sows in all herds were sampled prior to farrowing and piglets were sampled longitudinally at 21, 63, 100, 140 days of age and at slaughter. At all sampling events, samples were evaluated for M. hyopneumoniae detection by PCR. Lung lesions were observed and scored at slaughter. Prevalence in sows did not differ among herds. Prevalence at weaning was higher in piglets in herd A (PO1) ($p < 0.05$). However, from 100 days of age to slaughter age prevalence was higher in herd B (PO2-6) ($p < 0.05$) where lung lesion occurrence and severity was also higher in comparison to the other herds. Although result suggest no benefit of parity segregation in controlling M. hyopneumoniae infections, it is possible that gilt acclimation prior to the entry in the breeding herd associated with parity segregation could be advantageous.

Keywords: *Enzootic pneumonia, gilts, parity order, lung lesions.*

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Summary of vaccination protocols used in the herds.....	51
Table2. Distribution and prevalence of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> positive sows by PCR regarding different parity orders within the three herds.	52
Table3. Prevalence and extension of pneumonic lesions in pigs within three different herds	53

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Modelo de produção com parição segregada.....14

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. Herd sizes and pig flows of each production system included in the study...50

Figure 2. *Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence by PCR in piglets from weaning to slaughter within three different herds.....51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Sistemas de produção de suínos	12
2.1.1 Sistemas de reposição de leitões	12
2.1.2 Sistemas de produção com parição segregada	13
2.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
2.2.1 Etiologia	15
2.2.2 Patogenia	16
2.2.3 Epidemiologia	19
2.2.4 Sinais Clínicos e Lesões	21
2.2.5 Diagnóstico	23
2.2.6 Controle	26
3. ARTIGO CIENTÍFICO	30
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O Brasil exporta produtos de origem animal para mais de 180 países, destacando-se mundialmente como importante produtor de suínos, tendo produzido no ano de 2018 um total de 3.974 mil toneladas de carne suína, colocando-se na quarta posição entre os produtores e exportadores do produto no mundo, gerando uma receita de US\$ 1.211 milhões (ABPA, 2019). Em função das características dos sistemas de produção, onde os suínos são criados confinados em densidade elevada, associado à mistura de animais de diferentes origens nas fases de creche e terminação, as doenças respiratórias tornaram-se relevantes e limitantes para a produtividade, devido aos prejuízos econômicos que causam (MORÉS et al., 2015).

Mycoplasma (M.) hyopneumoniae é reconhecido como o causador primário da pneumonia enzoótica e um dos principais agentes infecciosos envolvidos no complexo de doenças respiratórias dos suínos (MAES et al., 2008). As infecções por *M. hyopneumoniae* causam perdas econômicas à indústria suinícola devido à redução no desempenho, variabilidade no crescimento, aumento na idade para atingir o peso de abate, custos com controle e tratamento e aumento na mortalidade em casos de infecções complicadas por outros agentes (HOLST et al., 2015).

A doença é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade e a transmissão ocorre principalmente pelo contato direto entre suínos infectados e suscetíveis, sendo que os sinais clínicos são normalmente observados em animais de crescimento e terminação (FANO et al., 2005; SIBILA et al., 2009). Sabe-se que os leitões nascem livres de *M. hyopneumoniae* (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000), porém uma quantidade significativa pode ser desmamada positiva (FANO et al., 2007), demonstrando que a transmissão horizontal da porca para o leitão tem papel fundamental na epidemiologia da doença (MAES et al., 2011). Ao comparar-se a prevalência de matrizes positivas para *M. hyopneumoniae* de acordo com a ordem de parto, Fano et al. (2006) observaram prevalência maior (32,67%) em leitões desmamados de fêmeas de ordem da parição 1 e 2, quando comparada com a prevalência em leitões de fêmeas de ordem de parto 3 e 4 (23,04%) e maior que 5 (20,4%) ($p < 0,05$).

Sabendo-se do papel das matrizes jovens na transmissão de *M. hyopneumoniae*, Takeuti et al. (2017b) avaliaram a dinâmica de infecção da bactéria em leitões de reposição interna em granjas brasileiras e observaram que aos 150 dias de idade a

prevalência de leitoas positivas para *M. hyopneumoniae* variou entre 47 a 67,4% e que até 15,7% desses animais podiam ser detectados positivos próximos ao primeiro parto. A ausência de exposição desses animais frente ao *M. hyopneumoniae* quando jovens permite com que quantidades significativas de leitoas cheguem ao primeiro parto excretando a bactéria e transmitindo a infecção aos seus leitões. Ainda, subpopulações de leitoas negativas para *M. hyopneumoniae* podem ser detectadas em granjas positivas até o primeiro parto, tornando-as suscetíveis à infecção em partos subsequentes (TAKEUTI et al., 2017a).

A segregação de partos através do quinto sítio tem sido utilizada na suinocultura como uma forma de controle de diversas doenças, incluindo a pneumonia enzoótica (MAES et al., 2008). Segundo Moore (2005), a segregação de partos facilita a adoção de medidas de controle para doenças específicas. O autor exemplifica que foi observada uma redução na severidade das lesões de pneumonia enzoótica em leitões filhos de fêmeas de ordem de parto 2 quando comparados com filhos de fêmeas de ordem de parto 1, sendo que não houve diferenças nos protocolos de vacinação e antibioticoterapia entre os grupos. Todavia, outros estudos divergem no que diz respeito à influência da segregação da produção em sítios sobre a dinâmica de infecção do *M. hyopneumoniae*. Dada a importância das leitoas na transmissão de *M. hyopneumoniae* para leitões lactentes, e que estas podem representar até 25% do rebanho reprodutivo de uma granja (FURTADO et al., 2006), o objetivo deste estudo foi avaliar de forma comparativa o efeito da segregação de partos sobre a dinâmica de infecção de *M. hyopneumoniae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas de produção de suínos

Diferentes modelos de produção podem ser encontrados na suinocultura brasileira, que variam principalmente quanto ao número de sítios, podendo ser divididos em sistemas de ciclo completo ou distribuídos em múltiplos sítios (BRANDT, 2007; MACHADO & DALLANORA, 2014). Dentro da produção em sítios existe a classificação em dois, três, quatro e cinco sítios (BRANDT, 2007). A produção em ciclo completo abrange todas as fases produtivas em um único local e tem como produto final o suíno terminado (NICOLAIEWSKY et al., 1998). No sistema de dois sítios a produção ocorre em dois locais independentes, um para a reprodução, maternidade e creche, e outro para a terminação dos animais. Uma modificação desse sistema é o *wean-to-finish*, em que o primeiro sítio consiste do plantel reprodutivo e maternidade, e o segundo sítio se caracteriza pela criação dos animais nas fases de creche e terminação na mesma instalação. Já a produção em três sítios consiste do alojamento do rebanho reprodutivo e maternidade em um local, da creche no segundo sítio e da terminação no terceiro sítio (MACHADO & DALLANORA, 2014). Quando adotados sistemas alternativos de reposição de leitoas, os sistemas podem ainda ser classificados em quatro ou cinco sítios, que serão revisados a seguir.

2.1.1 Sistemas de reposição de leitoas

O descarte de fêmeas suínas por motivos de idade avançada, problemas sanitários ou baixo desempenho reprodutivo faz necessária a disponibilidade de leitoas para reposição (KNOX, 2005). Além disso, a reposição de leitoas é um processo importante para a maximização da produtividade do rebanho através da melhoria genética dos animais (FURTADO et al., 2006). As taxas de reposição anual atuais são de aproximadamente 45%, sendo que as leitoas contribuem em torno de 20% no total dos grupos de cobertura (MELLAGI et al., 2019). A suinocultura moderna permite duas modalidades básicas de substituição de matrizes: a reposição interna através da produção de matrizes na própria granja, ou a reposição externa através da aquisição de leitoas (FURTADO et al., 2006; BRANDT, 2008).

Na reposição interna, as matrizes são produzidas a partir de um estoque de avós ou bisavós mantidas dentro da própria granja. Os avôs e avós são animais puros oriundos de um rigoroso programa de seleção genética, e seu cruzamento tem como objetivo gerar o máximo de heterose nas fêmeas comerciais (FURTADO et al., 2006). O percentual dessa categoria de animais dentro da granja deve levar em consideração a eficiência produtiva da granja e a pressão de seleção desejada, e gira normalmente em torno de 10% (FURTADO et al., 2006; BRANDT, 2007).

Outro sistema consiste na reposição externa através da aquisição de leitoas pré-púberes a partir de granjas especializadas (multiplicadoras) e tem como principal vantagem o ganho genético. Neste modelo, na situação brasileira, as leitoas são quase sempre transferidas para a granja de destino entre 140 e 160 dias de idade (FURTADO et al., 2006). Atualmente a reposição de animais com *status* sanitário elevado tem se tornado comum, um exemplo disso é a reposição com leitoas negativas para *M. hyopneumoniae* em plantéis positivos (PIETERS & FANO, 2016).

Dentro da reposição externa, existem modelos que permitem a separação das leitoas do plantel reprodutivo em uma unidade de produção especializada nessa categoria, sendo eles o quarto sítio e o quinto sítio (BRANDT, 2007). O quarto sítio é um local especializado na preparação de leitoas, em que a reposição de leitoas consiste no recebimento de matrizes gestantes com 35 a 40 dias de gestação (BRANDT, 2007; MACHADO & DALLANORA, 2014). Já o conceito de quinto sítio leva em consideração a possibilidade de categorização das granjas de acordo com a ordem de parto devido à diferença de produtividade dos leitões filhos de primíparas (BRANDT, 2007). Nesse local ocorrem: a preparação, a inseminação, o primeiro parto das primíparas e cobertura após o primeiro parto para posterior transferência das matrizes para o rebanho de múltíparas. As vantagens desse sistema incluem a adequada preparação e manejo das leitoas e ganho sanitário dos leitões na creche, recria e terminação (MACHADO & DALLANORA, 2014).

2.1.2 Sistemas de produção com parição segregada

Nos sistemas com parição segregada ocorre a separação das leitoas (OP0) e primíparas (OP1) do rebanho de matrizes mais velhas (OP \geq 2). Da mesma forma há a separação completa da progênie das matrizes OP1 das matrizes OP \geq 2, como ilustra a

Figura 1. Em termos práticos, a preparação das leitoas e inseminação pode ocorrer no quarto sítio ou no quinto sítio, e o primeiro parto e inseminação da primípara ocorre no quinto sítio, permitindo a criação segregada dos leitões filhos de primíparas das demais ordens de parto (BRANDT, 2007; MACHADO & DALLANORA, 2014).

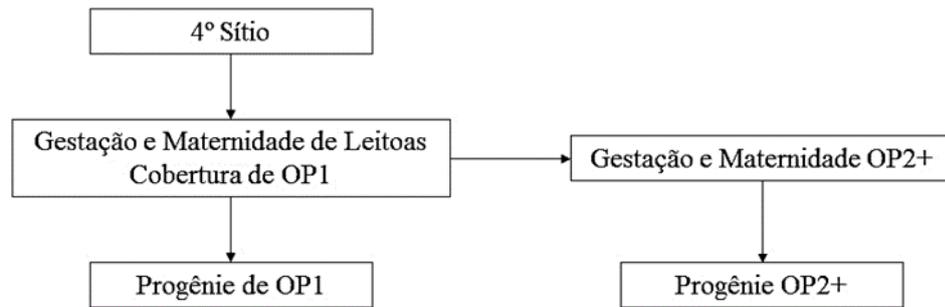


Figura 1. Modelo de produção com parição segregada (Adaptado de BRANDT, 2007).

Este modelo de produção leva em consideração a comprovada diferença sanitária existente entre os leitões filhos de primíparas e os descendentes das matrizes das demais ordens de parição (MACHADO & DALLANORA, 2014) permitindo a manutenção de dois *status* sanitários distintos nos rebanhos, um imunologicamente restrito, originado dos filhos de primíparas e outro considerado mais resistente, originado por matrizes de ordem de parto maior ou igual a 2 (BRANDT, 2007). A utilização da parição segregada possibilita a utilização de manejos sanitário, reprodutivo e nutricional específicos para leitoas e instalações apropriadas para essa categoria (MOORE, 2005). As vantagens sanitárias da parição segregada estão relacionadas ao fato de que as primíparas e sua progênie possuem *status* imune inferior e são animais de alto risco para a disseminação de doenças (MOORE, 2005; GADD, 2011). Com a utilização desse modelo de introdução de matrizes no plantel, a sanidade é estabilizada, e o mesmo se aplica às suas progênes. Além disso, o agrupamento de leitoas em uma instalação permite a adoção de programas sanitários específicos (MOORE, 2005). Nesse sentido a parição segregada pode ser utilizada como método de controle para PRSS (Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína), infecções por *M. hyopneumoniae* e algumas formas de diarreias em leitões (MOORE, 2005; MAES et al., 2008; GADD, 2011). Os custos com medicação também são reduzidos em planteis que não possuem leitoas, assim como aqueles que alojam filhos de matrizes de ordem de parto maior ou igual a 2 (GADD, 2011).

Do ponto de vista nutricional, as vantagens estão relacionadas à premissa de que os requerimentos nutricionais diferem entre fêmeas jovens e de idade mais avançada. Em particular, a primípara é mais vulnerável à perda proteica durante a primeira lactação, o que pode aumentar o intervalo desmame-estro e diminuir o tamanho da leitegada no próximo parto (BOYD et al., 2008). A utilização da parição segregada permite, portanto, a adoção de estratégias nutricionais direcionadas para cada ordem de parição.

Em termos de instalações e manejo, a parição segregada possibilita a utilização de instalações menores, com gaiolas de gestação e celas parideiras menores, devido ao fato de que as leitoas estão ainda em crescimento. O manejo nutricional, indução à puberdade e inseminação da leitoa também ficam concentrados nessa unidade produtiva especializada (MOORE, 2005).

Apesar das vantagens, existem riscos associados à adoção deste sistema de reposição. A parição segregada reduz a flexibilidade do sistema, principalmente em casos de surtos de doença, pois os animais são movidos regularmente. Nesse sentido, o número de movimentações de animais também é aumentado, com maiores custos e riscos à biossegurança. Do ponto de vista sanitário, se não realizada correta aclimação das fêmeas de reposição, existe a possibilidade da introdução de animais susceptíveis no rebanho de multíparas (MOORE, 2005).

2.2 *Mycoplasma hyopneumoniae*

2.2.1 Etiologia

O gênero *Mycoplasma* pertence à classe dos Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae (PIETERS & MAES, 2019). Os micoplasmas diferem de outras bactérias pelo seu pequeno tamanho, ausência de parede celular e por serem os menores e mais simples microrganismos procariontes capazes de se auto replicar (RAZIN et al., 1998; VRANCKX et al., 2011; SIMIONATTO et al., 2013; PIETERS & MAES, 2019). A célula dos micoplasmas é do tipo Gram-positiva, porém é fracamente corada pelo Gram, e contém um conjunto mínimo de componentes essenciais para seu crescimento: a membrana plasmática, os ribossomos e uma molécula de fita dupla de DNA (QUINN et al., 1994; RAZIN et al., 1998). Por sua inabilidade genética em formar parede celular rígida, essas bactérias são pleomórficas e compostas por uma membrana

plasmática composta de proteínas, glicoproteínas, glicolipídios e fosfolipídios (QUINN et al., 1994). O genoma dos micoplasmas é pequeno e possui um alto conteúdo de adenina+timina (A+T) (PIETERS & MAES, 2019). Ainda, devido ao tamanho reduzido do genoma, os Mollicutes não possuem diversas rotas metabólicas, fazendo com que a aquisição de metabólitos essenciais seja dependente do seu meio de crescimento e/ou do hospedeiro (SIMIONATTO et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013; PIETERS & MAES, 2019). Mais de 120 espécies de *Mycoplasma* já foram descritas, e entre elas, diversas são causadoras de doenças em animais, humanos e plantas, enquanto que algumas são comensais (RAZIN et al., 1998; SIQUEIRA et al., 2013).

Diversas espécies de micoplasmas já foram identificadas em suínos. *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*), *M. flocculare* e *M. hyorhinis* são os mais importantes no trato respiratório (SIQUEIRA et al., 2013). Outros como *M. hyosynoviae* e *M. suis* também são patogênicos para suínos, causando artrites e a eperitrozoonose suína, respectivamente (MAES et al., 2011).

M. hyopneumoniae foi isolado primeiramente por Maré & Switzer (1965) nos Estados Unidos, e por Goodwin et al. (1965) no Reino Unido (proposto como *Mycoplasma suipneumoniae*), e desde então seu papel como agente causador de doença respiratória em suínos tem sido reconhecido (ROSE et al., 1979; PIETERS & MAES, 2019). O cultivo e isolamento do *M. hyopneumoniae* pode ser feito a partir de amostras de pulmões afetados, secreções dos brônquios, traqueia e da cavidade nasal, porém é lento e complexo (PIETERS & MAES, 2019).

As cepas de *M. hyopneumoniae* podem ser antigenicamente e geneticamente diversificadas (BETLACH et al., 2019). Até o momento os genomas completos de dez cepas de *M. hyopneumoniae* foram sequenciados (GENEBANK, 2020). O tamanho do genoma varia de 893 a 926 Kpb, com um conteúdo de G+C de aproximadamente 28% (VRANCKX et al., 2011; GARCIA-MORANTE et al., 2017c).

2.2.2 Patogenia

A patogênese do *M. hyopneumoniae* é complexa e compreende a colonização em longo prazo do epitélio respiratório, a estimulação de reação inflamatória prolongada, a supressão e a modulação das respostas imunes e a interação com outros agentes (PIETERS & MAES, 2019).

No trato respiratório, *M. hyopneumoniae* pode ser encontrado aderido ao epitélio de brônquios e bronquíolos, onde causa importante degeneração ciliar, sendo raramente encontrado nos alvéolos (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982; BLANCHARD et al., 1992; SARRADELL et al., 2003). Zhang et al. (1995) caracterizaram o envolvimento da proteína de superfície P97 na adesão da bactéria aos cílios, a qual é codificada por um *operon* de dois genes que também codificam outra proteína de superfície, denominada P102, que também é expressa *in vivo* durante o curso da doença. Ambas são membros de famílias parálogas, da qual a maioria das adesinas faz parte (HSU & MINION, 1998; ADAMS et al., 2005; SEYMOUR et al., 2010). De fato, a capacidade de adesão do *M. hyopneumoniae* está relacionada a diversas lipoproteínas, como a adesina P97, e diversas proteínas semelhantes às adesinas incluindo P68, P102, P116, P146, P159, P216 (REOLON et al., 2014; LIU et al., 2019). A maioria das proteínas dessas famílias é clivada após a transcrição, de forma que os fragmentos resultantes são expressos na superfície da membrana e aderem a diversos componentes da matriz extracelular como a fibronectina, plasminogênio, mucina e heparina (SEYMOUR et al., 2010; VRANCKX et al., 2011; TACCHI et al., 2016). Recentemente, Raymond et al. (2018) demonstraram que subpopulações (aproximadamente 8%) de células de *M. hyopneumoniae* podem ser captadas para o meio intracelular de células epiteliais de rim suíno (PK-15) e sobreviverem aos eventos lisossomais. Entretanto a relevância desse achado na patogênese da pneumonia enzoótica necessita de maiores investigações.

O dano tecidual causado por *M. hyopneumoniae* deve-se à sua ação direta, associado à modulação da resposta imune com consequências patológicas (VRANCKX et al., 2011). Foi sugerido que o aumento do Ca^{2+} intracelular em células do epitélio respiratório possa estar relacionado ao dano ciliar (PARK et al., 2002). Outro provável mecanismo de dano tecidual está relacionado à produção de formas tóxicas de peróxido de hidrogênio a partir do metabolismo do glicerol pela glicerol 3-fosfato oxidase (FERRARINI et al., 2016; 2018). Além disso, proteínas com atividade de nuclease e protease foram identificadas em cepas de *M. hyopneumoniae* (VASCONCELOS et al., 2005; HENTHORN et al., 2018).

Após a colonização, ocorre uma série de interações entre o agente e o sistema imune do hospedeiro. Embora a resposta imune seja eficiente em prevenir a disseminação sistêmica do *M. hyopneumoniae*, é incapaz de resolver rapidamente a infecção, resultando em uma colonização crônica das vias aéreas e em uma resposta inflamatória prolongada

(THACKER & MINION, 2012). A adesão parece ser necessária no processo de infecção, uma vez que cepas atenuadas por passagem *in vitro* diminuem sua capacidade adesiva e de causar lesões pulmonares (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982; DEBEY & ROSS, 1994). A ativação do sistema imune ocorre após o reconhecimento das lipoproteínas de superfície do *M. hyopneumoniae* pelos macrófagos através dos *toll-like receptors* 2 e 6 (MUNETTA et al., 2003). Em seguida, há a indução da produção de uma série de citocinas pró inflamatórias incluindo IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 e TNF α (CHOI et al., 2006; LORENZO et al., 2006; REDONDO et al., 2009), que por sua vez são responsáveis pelo recrutamento dos linfócitos sanguíneos, e à medida que o epitélio é colonizado, podem ser observados nos tecidos peribronquiolares e perivasculares do tecido conjuntivo adjacente e nódulos linfoides, infiltrados de células, predominantemente CD4⁺ (linfócitos “T helper”)(SARRADELL et al., 2003; VRANCKX et al., 2011). A estimulação exagerada de células Th1 leva à ativação patogênica de linfócitos citotóxicos, enquanto que a estimulação de células Th2 ativa a produção de anticorpos pelos linfócitos B (VRANCKX et al., 2011), apesar de a soroconversão ser lenta e a imunidade local decrescer rapidamente (GARCIA-MORANTE et al., 2017a). Os pulmões de suínos experimentalmente infectados apresentam elevadas quantidades de células secretoras de IgG e IgA dos 7 aos 21 dias pós infecção, mas não dos 28 aos 35 (REDONDO et al., 2009). Aliado ao efeito imunomodulador, *M. hyopneumoniae* causa também um efeito imunossupressor no hospedeiro: o mecanismo fagocítico dos macrófagos é reduzido durante a infecção, associado ao aumento de PGE₂, o que contribui para a perda da eficiência na redução do microbismo do trato respiratório, apesar de que ainda representem a primeira linha de defesa(CARUSO & ROSS, 1990; MUNETA et al., 2006). Recentemente, estudos *in vitro* (DEENEY et al., 2019) sugeriram que *M. hyopneumoniae* é capaz de evadir a captação pelos macrófagos alveolares. Além disso, embora ocorra a secreção de IL-18, a secreção de interferon- γ está reduzida, o que diminui a resposta imune mediada por células (MUNETTA et al., 2006).

Apesar de ser considerado um patógeno extracelular e restrito ao trato respiratório, *M. hyopneumoniae* já foi isolado de tecidos não respiratórios em condições experimentais, como fígado, baço, rins e linfonodos bronquiais, entretanto a presença do agente nestes tecidos parece ser transitória e não estar envolvida no desenvolvimento da doença (LE CARROU et al., 2006; MAROIS et al., 2007).

2.2.3 Epidemiologia

As infecções por *M. hyopneumoniae* são altamente prevalentes na maioria das áreas produtoras de suínos do mundo. Em países europeus como a Dinamarca, Finlândia e Suíça, programas de erradicação têm sido utilizados, enquanto que nos demais países do continente a doença é endêmica (MAES et al., 2008). Nos Estados Unidos programas de erradicação também são amplamente utilizados. No Brasil a prevalência de lesões sugestivas de pneumonia enzoótica ao abate varia em média entre 50 a 70% (TAKEUTI & BARCELLOS, 2017).

O agente pode ser introduzido em um rebanho através de duas rotas: pela transmissão direta entre animais, ou via aerossóis. Uma vez no plantel, *M. hyopneumoniae* é transmitido horizontalmente de animais infectados para os não infectados através de gotículas geradas por tosse ou espirros, ou por contato nasal direto entre animais (SIBILA et al., 2009). A transmissão horizontal é considerada importante fator de risco em populações cronicamente infectadas, onde a transmissão é mais frequente nas fases de creche, recria e terminação. Nesse sentido, Fano et al. (2005) demonstraram evidências de infecção em animais negativos 28 dias após a introdução de animais infectados nas baias (contato direto), e após 42 dias em animais de baias distantes (contato indireto), sugerindo um padrão lento de disseminação mesmo em contato direto. No mesmo trabalho, os autores ainda demonstraram a persistência da infecção em suínos até os 185 dias pós-infecção (p.i.). Em contrapartida, Pieters et al. (2009) demonstraram a eliminação da bactéria e transmissão de animais infectados para susceptíveis por até 214 dias p.i. em condições experimentais.

Outra forma de transmissão direta ocorre verticalmente entre porca e leitão, sendo também uma importante forma de manutenção da doença nos planteis (FANO et al., 2007; SIBILA et al., 2009). Os leitões nascem livres de *M. hyopneumoniae*, mas grande quantidade pode ser desmamada positiva (PIETERS, 2012). Fano et al. (2007) observaram uma prevalência ao desmame de até 51,28%. Estes leitões representam uma importante fonte de infecção para animais susceptíveis nas fases subsequentes, principalmente devido ao caráter crônico da infecção (até 214 dias p.i.) (SIBILA et al., 2006; PIETERS et al., 2009). Em condições experimentais, a taxa de reprodução ajustada (R_n) média em leitões na fase de creche foi de 1,16, ou seja, um animal infectado ao

desmame irá infectar em média um outro animal durante a fase de creche (MEYNS et al., 2004). Ainda, animais infectados até o desmame são mais propensos a apresentarem lesões severas ao abate (FANO et al., 2007).

Sabe-se também que fêmeas de menor ordem de parição (OP) representam um grupo de risco para a transmissão vertical uma vez que são mais propensas a transmitir *M. hyopneumoniae* para seus leitões (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000), já que uma proporção maior de matrizes jovens é detectada positiva por PCR (reação em cadeia da polimerase) quando comparada a matrizes de maior OP (PIJOAN, 2003). Fano et al. (2006) observaram que leitões desmamados de fêmeas de OP 1 e 2, apresentaram maior taxa de positividade ao desmame através de análise por PCR (32,67%) quando comparados com leitões de fêmeas de OP 3 e 4 (23,04%), entretanto, fêmeas de OP maiores podem ainda ser positivas ao PCR e constituem um risco para a transmissão (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). Takeuti et al. (2017b) avaliaram a dinâmica de infecção por *M. hyopneumoniae* em leitões de reposição interna em granjas brasileiras e observaram que aos 150 dias de idade a prevalência de leitões positivos variou entre 47 a 67,4%, e que até 15,7% desses animais podem ser detectados positivos próximo ao primeiro parto. A ausência de exposição dos animais ao *M. hyopneumoniae* quando jovens possibilita que quantidades significativas cheguem ao primeiro parto excretando a bactéria e sendo possíveis fontes de contaminação aos seus filhos. Ainda, subpopulações de leitões negativas para *M. hyopneumoniae* podem ser detectadas em granjas positivas até o primeiro parto devido à falta de exposição precoce, o que as torna suscetíveis à infecção em partos subsequentes (TAKEUTI et al., 2017a). Estes estudos demonstram a importância de leitões ou matrizes de menor OP na transmissão de *M. hyopneumoniae* para suas leitegadas durante o período lactacional.

Outras formas de transmissão já foram descritas. A transmissão de *M. hyopneumoniae* pelo ar através de longas distâncias foi demonstrada e foi a provável causa de contaminação de rebanhos livres (STARK et al., 1992). Stark et al. (1998) detectaram o agente por *nested* PCR em amostras de ar de granjas com problemas respiratórios, e Otake et al. (2010) demonstraram o transporte de partículas infecciosas de *M. hyopneumoniae* por distâncias de até 9,2 Km. A transmissão mecânica por fômites foi sugerida, entretanto o papel de funcionários não foi demonstrado como fator de risco na infecção de rebanhos livres, desde que praticadas medidas de biossegurança básicas (BATISTA et al., 2004).

As cepas de *M. hyopneumoniae* podem ser diversificadas ao nível antigênico, proteômico, transcriptômico e genômico (BETLACH et al., 2019), e variações na virulência foram identificadas entre isolados (VICCA et al., 2003; THACKER & MINION, 2012). Granjas geograficamente próximas podem ser infectadas pela mesma variante, por um número limitado de variantes ou por cepas não relacionadas filogeneticamente, enquanto que uma granja pode abrigar uma ou um número variado de variantes (GARCIA-MORANTE et al., 2017c). Dos Santos et al. (2015) avaliaram por MLVA (*Multi-locus variable number of tandem repeats (VNTR) analysis*) a variabilidade genética de *M. hyopneumoniae* de quatro países (EUA, Brasil, Espanha e México) e observaram um grande número de variantes baseadas nos *locus* P97 e P146 circulando em suínos nesses países. No Brasil foram detectadas 39 variantes, sendo a 12-14 a mais frequente e presente em 8 estados diferentes. Outro estudo recente realizado no Brasil (BALESTRIN et al., 2019) avaliou através de MLST (*Multi-locus sequence typing*) a diversidade de clones de *M. hyopneumoniae* circulantes no país. O estudo revelou a ocorrência de cinco novos *sequence types* (ST) únicos do Brasil, sendo mais prevalente o ST-69. Outros estudos demonstram ainda que um animal pode ser acometido por mais de uma cepa, e a quantidade delas está diretamente relacionada com a severidade e a frequência das lesões pulmonares (MICHIELS et al., 2017).

2.2.4 Sinais Clínicos e Lesões

A doença pode ocorrer de forma epidêmica ou endêmica. Surtos epidêmicos são raros e ocorrem quando *M. hyopneumoniae* é introduzido em rebanhos imunologicamente negativos, afetando animais de todas as idades de forma rápida, podendo atingir 100%. Os sinais clínicos podem incluir tosse, dispneia, hipertermia e morte (PIETERS & MAES, 2019). Na forma endêmica a prevalência é particularmente alta em animais de terminação e a severidade dos sinais clínicos varia com a cepa envolvida, a pressão de infecção, a presença de infecções secundárias e as condições ambientais. A disseminação é lenta e quando não há o envolvimento concomitante de outros patógenos, a doença pode cursar de forma subclínica ou com sinais clínicos moderados, que incluem tosse não produtiva e redução do ganho de peso (SIBILA et al., 2009; PIETERS & MAES, 2019). Sørensen et al. (1997) observaram em condições experimentais que os sinais respiratórios iniciam em média 13 dias p.i. e cessam 2 meses p.i. Em relação ao ganho de peso, Strasser et al.

(1992) observaram que os animais infectados por *M. hyopneumoniae* apresentaram redução de 15-20% no ganho de peso às 24 semanas de vida, idade próxima ao abate, comparado aos suínos não infectados. Quando há o envolvimento de patógenos secundários os sinais podem evoluir para dispneia, hipertermia e morte (SIBILA et al., 2009; THACKER & MINION, 2012).

Em casos agudos as lesões macroscópicas causadas por *M. hyopneumoniae* no pulmão são caracterizadas por firmeza ao toque e falha no colabamento; já em casos crônicos as lesões consistem principalmente em áreas de consolidação cranioventrais púrpuras a acinzentadas, localizadas uni ou bilateralmente nos lobos apicais, cardíacos, acessório e porção cranial do diafragmático. Lesões em regressão apresentam espessamento do tecido conjuntivo interlobular com coloração esbranquiçada, e os linfonodos traqueobrônquicos encontram-se rígidos e aumentados (THACKER & MINION, 2012; GARCIA-MORANTE et al., 2016; PIETERS & MAES, 2019). A visualização das lesões depende do momento da infecção. Segundo Dos Santos et al. (2012) as lesões tendem a cicatrizar em 30 a 70 dias após o início dos sinais clínicos. Quando a infecção ocorre na creche, por exemplo, a maioria dos animais pode apresentar lesões cicatrizadas ao abate, enquanto que na infecção na fase de terminação os animais apresentarão lesões recentes, facilmente identificáveis macroscopicamente.

As lesões microscópicas são caracterizadas por pneumonia bronco intersticial com acúmulo de células linfóides nos tecidos peribronquial, peribronquiolar e perivascular, e aumento de folículos linfóides levando à diminuição do lúmen das vias aéreas. O epitélio dos brônquios e bronquíolos apresenta degeneração ciliar, com presença de descamação de células epiteliais e células mononucleares aumentadas, leucócitos e fluído no lúmen das vias aéreas. Há hiperplasia das células caliciformes nos brônquios e bronquíolos maiores, infiltrados de linfócitos e neutrófilos com espessamento do septo interalveolar e hiperplasia dos pneumócitos tipo II (KWON et al., 2002; SARRADELL et al., 2003; REDONDO et al., 2009).

A resposta inflamatória estimulada pelas citocinas é de fato o principal mecanismo responsável pela injúria causada aos pulmões (THACKER & MINION, 2012). Ao exame histopatológico são observados infiltrado celular inflamatório ao redor dos brônquios, bronquíolos e interstício, o septo interalveolar encontra-se espessado, e ocorre hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), podendo levar à redução do lúmen bronquiolar e atelectasia, observados macroscopicamente como áreas de consolidação

pulmonar. Em resumo, quatro mecanismos estão ligados à consolidação pulmonar durante a infecção: acúmulo de muco e exsudato inflamatório devido ao prejuízo ou perda da função mucociliar, aumento da atividade mucossecretora, bronco constrição mediada por macrófagos alveolares e células inflamatórias, e obstrução de brônquios e bronquíolos causada pelos agregados de tecido linfoide (SARRADELL et al., 2003).

2.2.5 Diagnóstico

Diversas ferramentas podem ser utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo *M. hyopneumoniae*. A avaliação dos sinais clínicos associados às lesões macroscópicas são a base de um diagnóstico presuntivo, entretanto outras enfermidades podem apresentar sinais e lesões semelhantes, além disso existe a possibilidade do envolvimento de agentes secundários, sendo necessária a confirmação laboratorial (SIBILA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2012).

O monitoramento dos sinais clínicos através da quantificação de tosse pode ser aplicado para estimar a ocorrência de pneumonias e doenças respiratórias crônicas em suínos (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2012). Esse método tem sido utilizado em vários estudos e consiste em estimular a movimentação dos animais e quantificar a ocorrência de tosse por um determinado período de tempo (SIBILA et al., 2009). Para Sobestiansky & Barcellos (2012), uma frequência de tosse igual ou maior que 10% é indicativa de problema significativo de pneumonia. No entanto, deve-se levar em consideração que tosse não é um sinal clínico específico de pneumonia, podendo ser facilmente observado em granjas com acúmulo de gases e poeira, principalmente no inverno, quando as instalações estão normalmente fechadas (TAKEUTI et al., 2018).

A monitoria de abate é frequentemente utilizada para estimar a ocorrência e severidade de pneumonia enzoótica e na identificação de casos subclínicos da infecção por *M. hyopneumoniae* em animais abatidos (SIBILA et al., 2009). Diversos métodos de graduação de lesões foram descritos para uso em nível de granja, abatedouro e experimental, e a maioria é baseada na visualização e palpação das lesões (GARCIA-MORANTE et al., 2016). Recentemente, Garcia-Morante et al. (2016) compararam oito métodos de graduação de lesões descritos em literatura científica, e observaram que existe alta correlação entre eles. As correlações mais fortes foram observadas entre métodos que levam em conta a contribuição percentual relativa de cada lobo pulmonar na área ou peso

total do pulmão. Caso seja necessária maior precisão, objetividade e repetibilidade, os autores recomendam métodos que envolvam mapas esquemáticos e análise de imagens dos pulmões. No Brasil, o Índice para Pneumonia (IPP) proposto por Piffer & Brito, (1991) é utilizado amplamente, e leva em consideração o peso relativo de cada lobo em relação ao peso total do pulmão. Em rebanhos onde o IPP é maior que 0,90 há a ocorrência grave de pneumonia, sendo a gravidade diretamente proporcional à elevação do índice (DALLA COSTA et al., 2000). No entanto, vale ressaltar que a técnica de monitoria de abate fornece informações relativas à presença de pneumonia no lote e não ao agente infeccioso envolvido, já que outros agentes infecciosos primários podem causar lesões muito semelhantes àsquelas presentes na infecção por *M. hyopneumoniae* e agentes secundários podem contribuir significativamente para a ampliação da extensão das lesões. Dessa forma exames laboratoriais são fundamentais para a identificação precisa do agente causal da pneumonia (TAKEUTI, informação pessoal).

O isolamento bacteriano a partir de pulmões afetados é considerado o teste diagnóstico “padrão ouro”, e apesar de ser sensível, requer meio de cultivo especial, é extremamente laborioso e fastidioso, podendo levar de 4 a 8 semanas (FRIIS, 1975). O meio líquido de Friis (1975) é amplamente utilizado no cultivo do *M. hyopneumoniae*, e a positividade é indicada pela alteração do pH do meio através da mudança da coloração de vermelho para amarelo, observada em 3 a 30 dias. Limitações da técnica incluem: a necessidade de adição de soro suíno livre de *M. hyopneumoniae* e o fato de que outros micoplasmas crescem mais rapidamente que *M. hyopneumoniae*, em especial *M. hyorhinis* (SIBILA et al., 2009; THACKER & MINION, 2012). A inoculação em meio sólido a partir do cultivo em meio líquido, seguido de incubação em atmosfera com 5-10% de CO₂ produz poucas colônias que são fracamente visíveis em 2-3 dias (ROSS & WHITTLESTONE, 2012; THACKER & MINION, 2012; GARCIA-MORANTE et al., 2017b). Devido à dificuldade na obtenção de colônias em cultivo em meio sólido, a titulação de *M. hyopneumoniae* é baseada no método de unidades de mudança de cor (CCU do inglês, *Color Changing Units*) ou na mensuração de ATP por luminometria (STEMKE & ROBERTSON, 1982; CALUS et al., 2010). Recentemente, Cook et al. (2016) propuseram meios seletivos melhorados para cultivo de *M. hyopneumoniae* com a adição de canamicina para inibição do crescimento de *M. hyorhinis*, e métodos de solidificação do meio de Friis com ágar enriquecido com DEAE-dextrano, onde foi possível uma recuperação mais eficiente de *M. hyopneumoniae*.

Para monitoria do *status* imunológico do rebanho, a detecção de anticorpos pelo teste de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ou menos frequentemente pela fixação do complemento podem ser realizados. O teste de ELISA representa um método rápido que fornece informações sobre a presença de anticorpos maternos ou adquiridos e o tempo decorrido até a soroconversão, e pode ser feito a partir de amostragens longitudinais ou transversais (SIBILA et al., 2009). A presença de anticorpos séricos é variável e os testes podem apresentar baixa sensibilidade, resultando em um elevado número de falsos negativos (THACKER, 2004; ERLANDSON et al., 2005). Ainda, o diagnóstico sorológico por ELISA não detecta animais em fases iniciais da infecção, nem diferencia animais infectados de vacinados (PIETERS et al., 2017).

Outros métodos diagnósticos incluem a detecção do agente e a localização das lesões, que pode ser confirmada por imuno-histoquímica (SARRADELL et al., 2003; REDONDO et al., 2009), imunofluorescência (PIFFER & ROSS, 1985; MAROIS et al., 2007) e hibridização *in situ* (KWON et al., 2002) a partir de tecido pulmonar fixado e parafinado.

O advento das técnicas moleculares possibilitou o diagnóstico de microrganismos fastidiosos como *M. hyopneumoniae* (KURTH et al., 2002). Os testes de PCR para *M. hyopneumoniae* apresentam maior sensibilidade e possuem a vantagem de serem realizados a partir de diversos tipos de amostras coletadas *in vivo* e *post mortem* (KURTH et al., 2002; PIETERS et al., 2017). Vários tipos de PCR foram desenvolvidos para amplificação do DNA de *M. hyopneumoniae*, incluindo reações do tipo convencional, *nested*, *multiplex* e *real-time* (SIBILA et al., 2009). As análises por PCR convencional são menos sensíveis ao detectar microrganismos de amostras clínicas como suabes nasais e traqueais. Nesse sentido, Calsamiglia et al. (1999) desenvolveram um *nested* PCR para amostras de suabe nasal utilizando dois pares de *primers* espécie específicos para o DNA ribossomal da subunidade 16S, que se mostrou mais sensível frente o PCR convencional e não apresentou reação cruzada com outros micoplasmas. Dubosson et al. (2004) descreveram dois ensaios de *real-time* PCR, para amostras de pulmão, direcionados para um elemento repetido do DNA e para o gene transportador ABC, que quando conduzidos em associação demonstraram 85% de sensibilidade. Marois et al. (2010) validaram um ensaio de *real-time* PCR *triplex* para as proteínas P46, P97 e P102 a partir de amostras coletadas *in vivo* ou *post mortem*. De modo geral, a detecção de *M. hyopneumoniae* por

PCR é uma técnica mais precisa e sensível para determinar o momento da infecção, mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos e desenvolvimento de imunidade quando comparada à soroconversão (SIBILA et al., 2009; PIETERS et al., 2017).

O sucesso do diagnóstico também depende do tipo de amostra coletada. Devido à praticidade, suabes nasais eram a amostra de escolha para avaliar, através de PCR a infecção por *M. hyopneumoniae* em condições de campo (FABLET et al., 2010). Entretanto, Marois et al. (2007) observaram uma maior taxa de detecção de *M. hyopneumoniae* a partir de suabes e lavados traqueais. Ainda, Kurth et al. (2002) e Fablet et al. (2010) obtiveram maior sensibilidade a partir de amostras traqueobrônquicas para *nested* PCR. Avaliando métodos de detecção nos estágios iniciais da infecção por real-time PCR, Pieters et al. (2017) observaram uma maior porcentagem de amostras positivas aos 5, 9, 21 e 28 d.p.i. em suabes laríngeos, que apresentam maior sensibilidade e praticidade quando comparadas às amostras traqueobrônquicas. Apesar disso, nos últimos anos, estudos demonstraram que a coleta de muco traqueobrônquico com a utilização de suabes ou cateteres representa um método prático e mais sensível para detecção de *M. hyopneumoniae* (VANGROENWEGHE et al., 2015, 2018; TAKEUTI et al., 2019). Ainda, o tipo de material utilizado nos suabes pode influenciar na detecção de *M. hyopneumoniae*. Suabes de *nylon* flocado apresentam melhor absorção e detecção de *M. hyopneumoniae* por real-time PCR se comparados a suabes de *rayon* (TAKEUTI et al., 2017c).

2.2.6 Controle

O controle das infecções por *M. hyopneumoniae* pode ser efetuado de diversas formas que incluem: otimização dos manejos e instalações, uso de antimicrobianos e vacinação (MAES et al., 2008).

A origem dos animais é também um fator de risco importante na transmissão de *M. hyopneumoniae*. As altas taxas de reposição, associadas à diversidade de origens das leitoas podem desestabilizar a imunidade do rebanho, aumentando a circulação de *M. hyopneumoniae* na granja (MAES et al., 2008). Além disso, os núcleos genéticos e granjas multiplicadoras têm focado na eliminação desse agente, fornecendo animais negativos para *M. hyopneumoniae* para granjas comerciais (ROOS et al., 2016), mas sendo necessário que as leitoas passem na chegada à granja de destino por período de quarentena

e adaptação (AMASS & BAYSINGER, 2006) para que possíveis microrganismos patogênicos não sejam introduzidos na granja e para que as leitoas tenham um menor risco de adoecer e excretar *M. hyopneumoniae* durante o parto e período lactacional. O primeiro parto é um momento crítico na transmissão de *M. hyopneumoniae* devido à maior probabilidade de leitoas não aclimatadas excretarem a bactéria e contaminarem seus leitões. Este fato, associado à baixa taxa de transmissão do agente (MEYNS et al., 2004) e a persistência da infecção por longos períodos (PIETERS et al., 2009), gera a necessidade de um efetivo manejo de aclimação de leitoas (GARZA-MORENO et al., 2018).

Os procedimentos atuais para a aclimação de leitoas consistem de uma combinação de vacinação, medicação e a exposição controlada ao agente previamente à introdução no rebanho produtivo (ROOS et al., 2016). Pieters & Fano (2016) sugerem que o início da aclimação deva ocorrer até no máximo 50 dias de idade, proporcionando tempo suficiente para que as leitoas sejam expostas e se curem até o primeiro parto. No entanto o recebimento de leitoas jovens é muitas vezes inviável, visto que geralmente não há estrutura física nas granjas para alojar os animais por um período prolongado. Na impossibilidade de recebimento de leitoas muito jovens e ocorrendo o recebimento na idade usual adotada no Brasil (em torno de 150 dias de idade), deve-se realizar a aclimação imediatamente após a chegada das leitoas (TAKEUTI et al., 2018). A exposição controlada tem sido realizada por métodos que incluem o contato direto com animais positivos (*seeders*), a inoculação intratraqueal e por aerossol. Roos et al. (2016) observaram que, para a utilização de *seeders*, são necessários 6 animais positivos em um grupo de 10 animais para se obter 100% de sucesso durante um contato de 4 semanas. A inoculação intratraqueal consiste da identificação de animais positivos por PCR, eutanásia e preparação do inóculo a partir dos pulmões desses animais, seguido da administração intratraqueal ou via aerossol (NICKEL et al., 2018; TAKEUTI et al., 2018). Utilizando um aspersor para inoculação via aerossol, Nickel et al. (2018) observaram que das leitoas expostas às 9 semanas de idade, 95% foram positivas ao PCR para *M. hyopneumoniae* em quatro semanas após a exposição, e 100% foram positivas na oitava semana após a exposição, demonstrando ser este um método efetivo e menos laborioso quando comparado à inoculação intratraqueal.

A vacinação é amplamente utilizada no controle das infecções por *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2018; GARZA-MORENO et al., 2019). A proteção vacinal

não é completa, uma vez que não previne a infecção (PIETERS et al., 2010) e o mecanismo protetivo consiste na modulação da resposta imune frente ao agente (VILLARREAL et al., 2011; MARCHIORO et al., 2013). Nos suínos vacinados, ocorre a diminuição da densidade de macrófagos no BALT, a redução no número de microrganismos nos pulmões, menor severidade da apresentação clínica e das lesões pulmonares (PIETERS & SIBILA, 2017). A maioria das vacinas comerciais disponíveis atualmente consiste em vacinas inativadas ou vivas atenuadas (MAES et al., 2008; TAO et al., 2019), administradas parenteralmente. Variados protocolos são aplicáveis a leitões, que em geral consistem da vacinação próxima ao desmame ou ao desmame (21 dias), podendo ou não haver aplicação de uma segunda dose 2-4 semanas após (MAES et al., 2018). Além disso, a vacinação de leitoas pode ser utilizada combinada às medidas de manejo, demonstrando bom estímulo à resposta imune em animais expostos frente ao *M. hyopneumoniae* (HOLST et al., 2015). A utilização de 2 ou 4 doses após a entrada das leitoas na aclimação reduz a pressão infectante do patógeno, a variabilidade genética e fornece altos níveis de anticorpos às leitoas e sua progênie (GARZA-MORENO et al., 2019). A vacinação das porcas é menos comum, mas pode ser utilizada. Em estudo conduzido por Arsenakis et al. (2019) a vacinação de porcas com duas doses no período gestacional (3 e 6 semanas pré-parto) foi capaz de reduzir a colonização dos leitões após o desmame e a prevalência de lesões pulmonares ao abate em rebanho com alto desafio, mas não apresentou diferença significativa em um rebanho com baixo desafio para *M. hyopneumoniae*.

A terapia antimicrobiana pode ser utilizada de forma terapêutica ou preventiva, uma vez que a proteção vacinal não é completa (GARZA-MORENO et al., 2019). Devido à ausência de parede celular, *M. hyopneumoniae* é intrinsecamente resistente aos antibióticos beta-lactâmicos (MAES et al., 2008). Drogas efetivas contra o agente incluem as tetraciclinas, macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas e fluoroquinolonas (MAES et al., 2018). Recentemente isolados brasileiros foram avaliados quanto a susceptibilidade a antimicrobianos em relação ao perfil genético através do teste de concentração inibitória mínima (CIM) (GONZAGA et al., 2019). Segundo os autores, os diferentes isolados podem diferir quanto a susceptibilidade a diferentes antimicrobianos, e os menores valores de CIM foram encontrados para os enrofloxacin e tiamulina. No processo de aclimação de leitoas, devem ser evitados antimicrobianos efetivos contra *M. hyopneumoniae*, uma vez que é desejável a infecção nesse período; nesses casos, faz-

se o uso de drogas as quais *M. hyopneumoniae* é resistente, a fim de evitar ou tratar eventuais infecções secundárias (TAKEUTI et al., 2018).

Protocolos de erradicação podem ser utilizados quando não se obtém sucesso no controle, ou quando a criação de animais livres de *Mycoplasma* é desejada. Vários protocolos foram descritos e incluem: o despovoamento total ou parcial, seguido de repovoamento; o fechamento do rebanho com medicação; ou a medicação sem fechamento do rebanho (HOLST et al., 2015). Indiferentemente do protocolo utilizado, é frequente o sucesso do processo, mas são comuns as recontaminações. De forma geral, a eliminação do agente do rebanho é viável em termos econômicos, mesmo que o rebanho permaneça livre por apenas um ano (SILVA et al., 2019).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido.

Formatado conforme as normas do periódico *Veterinary Microbiology*.

1 Effect of parity segregation on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics and on
2 occurrence and severity of pneumonic lesions in pigs

3

4 Ricardo Augusto Neves Forner¹, Karine Ludwig Takeuti¹, Elisa Rigo de Conti¹, Monica
5 Santi², Fernando Pandolfo Bortolozzo¹ & David Emilio Santos Neves de Barcellos^{1*}

6

7 ¹Department of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Federal University of
8 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

9 ²Master Agroindustrial, Videira, SC, Brazil.

10

11 *Corresponding author. Mailing address: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal
12 do Rio Grande do Sul, NO 9090, Av. Bento Gonçalves, Agronomia, Porto Alegre, Brazil,
13 91540-000.

14 E-mail: davidbarcellos@terra.com.br

15

16 **Highlights**

- 17 • *M. hyopneumoniae* infection dynamics was evaluated in 3 farms segregated by
18 parity.
- 19 • Pigs were sampled longitudinally and lung lesions were evaluated at slaughter.
- 20 • Prevalence in pigs was higher in the PO2-6 herd from 100 days of age to slaughter.
- 21 • Occurrence and severity of lung lesions were higher in the PO2-6 herd.

1 **Abstract**

2 Gilts represent a group risk for *Mycoplasma hyopneumoniae* vertical transmission in
3 swine herds. Therefore, parity segregation can be an alternative to control *M.*
4 *hyopneumoniae* infections. The study evaluated the effect of parity segregation on *M.*
5 *hyopneumoniae* infection dynamics and occurrence and severity of lung lesions at
6 slaughter. For that three multiple site herds were included in the study. Herd A consisted
7 of the farm where gilts would have their first farrowing (parity order 1 herd). After the
8 first farrowing parity order (PO) 1 sows were transferred to herd B (PO2-6 herd). Herd C
9 was a conventional herd with gilt replacement (PO1-6 herd). Piglets born in each herd
10 were raised in separated nursery and finishing units. Sows in all herds were sampled prior
11 to farrowing and piglets were sampled longitudinally at 21, 63, 100, 140 days of age and
12 at slaughter for *M. hyopneumoniae* detection by PCR. Lung lesions were assessed at
13 slaughter. *M. hyopneumoniae* prevalence in sows did not differ among herds. Prevalence
14 of positive piglets for *M. hyopneumoniae* was higher at weaning in the PO1 herd (A) (p
15 < 0.05). However, prevalence of positive pigs was higher in the PO2-6 herd (B) ($p < 0.05$)
16 from 100 days of age to slaughter age. Lung lesion occurrence and severity was higher in
17 herd B. Possibly one factor that might have influenced the results is the lack of a proper
18 gilt acclimation, which led to sows being detected positive at farrowing, regardless of the
19 parity order.

20

21 **Keywords:** Enzootic pneumonia, sow farm, gilts, parity order, lung lesions.

1 **Introduction**

2 *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* is the primary causative agent of enzootic
3 pneumonia in pigs and it is considered an important primary pathogen in the porcine
4 respiratory disease complex (PRDC) along with some viral and other bacterial pathogens
5 causing significant economic impacts to swine industry worldwide (Maes et al., 2018).
6 *M. hyopneumoniae* infection is characterized by dry, non-productive coughing, decreased
7 daily weight gain and reduced feed conversion efficiency (Sibila et al., 2009).

8 Transmission of *M. hyopneumoniae* within a herd can occur horizontally, from
9 infected to naïve pigs, or from sows to their progeny, by direct or indirect contact during
10 farrowing (Fano et al., 2005; Sibila et al., 2006). Even though piglets are born free of *M.*
11 *hyopneumoniae*, a variable number of them can be detected positive at weaning (Fano et
12 al., 2007; Nathues et al., 2013), since sow shedding during the lactation period
13 significantly influences the probability of piglet colonization at weaning (Pieters et al.,
14 2014). Moreover, dam parity order (PO) may also influence the piglet colonization by *M.*
15 *hyopneumoniae* at weaning as young parity sows are more likely to transmit *M.*
16 *hyopneumoniae* to their offspring (Fano et al., 2006).

17 Despite the importance of gilts in *M. hyopneumoniae* infection dynamics,
18 approximately 50% of gilts are introduced in pig farms each year in order to replace culled
19 sows (Furtado et al., 2006). High replacement rates increase the occurrence of the disease
20 (Nathues et al., 2013) and increase strain variability within the herd (Vranckx et al., 2011).
21 Recent studies (Takeuti et al., 2017a) demonstrated that up to 15.7% of replacement gilts
22 can be detected positive by PCR at first farrowing, and subpopulations of negative sows
23 can be detected at the first farrowing in positive herds, making them susceptible in
24 subsequent parities (Takeuti et al., 2017b). For that purpose, a proper acclimation strategy
25 should be adopted, allowing enough period for gilts to become infected, recover and stop

1 shedding the bacterium by the time of parturition (Pieters and Fano, 2016). Since infection
2 can last up to 214 days (Pieters et al., 2009), acclimation should start at 50 days of age
3 (Pieters and Fano, 2016) or as soon as the gilts enter the herd. However, this management
4 is laborious and physical space to house the young incoming gilts is necessary, making
5 this practice not applicable to some farms.

6 Parity segregation has been used in swine production as a control measure for
7 several diseases including enzootic pneumonia (Maes et al., 2008). Segregating gilts and
8 their offspring from the multiparous sow herd and their progeny until gilts reach their
9 second gestation allows enough time for gilts to acquire a desirable immune status,
10 reducing the risk of herd destabilization if adequate acclimation is performed (Maes et
11 al., 2008; Gadd, 2011). In addition, the segregation of the primiparous sows offspring
12 from the multiparous sows litters in two different flows allows the maintenance of two
13 distinct health status and reduce the risk of disease transmission (Brandt, 2007). Parity
14 segregation is reported as a control measure for piglet diarrhea, PRRSv (Porcine
15 Reproductive and Respiratory Syndrome virus) and *M. hyopneumoniae* infections, and
16 reducing medication costs in sow herds without gilts (Moore, 2005; Gadd, 2011). A
17 decrease on the severity of pneumonic lung lesions suggested of *M. hyopneumoniae*
18 infection in slaughtered pigs has been described with the adoption of parity segregation
19 (Moore, 2005). However, no research has been done on the infection dynamics of *M.*
20 *hyopneumoniae* in parity segregated systems. Therefore, this study aimed to evaluate the
21 effect of parity segregation on infection dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae*, and
22 on occurrence and severity of lung lesions in pigs.

23

24

25

1 **Materials and Methods**

2 Study procedures were conducted under the approval of the Research Committee
3 of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (protocol number 36730). All
4 farms enrolled in this study followed their own management practices.

5

6 *Herds*

7 The study was carried out on three production systems (A, B and C) with three
8 sites (farrowing unit, nursery and finishing unit) each, being each farrowing unit the only
9 source of piglets to their respective downstream flow, all located in the midwestern region
10 of Santa Catarina state, Brazil. The study was carried out between January and August
11 2018.

12 All replacement gilts (Agroceres PIC Camborough) were raised in a multiplier
13 farm positive for *M. hyopneumoniae* and PRRSV negative up to 63 days of age (doa), then
14 moved and housed in a finishing unit up to 180 doa. After that, gilts were moved to a gilt
15 development unit (GDU) where they were vaccinated against reproductive diseases
16 (Eryseng Parvo Lepto®, Hipra, Girona, Spain) and atrophic rhinitis (Porcilis ART®,
17 MSD Saúde Animal, Brazil) and inseminated. No acclimation with controlled exposure
18 to *M. hyopneumoniae* was performed during this period. From the GDU, gilts were
19 transported either to farrowing unit A on a weekly basis, or farrowing unit C on a monthly
20 basis at approximately 40 days of gestation. In farrowing unit A, gilts had their first
21 farrowing and after the lactation period, they were inseminated and transferred to the
22 farrowing unit B at approximately 40 days of gestation on a weekly basis. Briefly,
23 farrowing unit A consisted on gilts only, while farrowing unit B received primiparous
24 sows for replacement, and farrowing unit C consisted on a usual farm with gilts and older
25 sows. Annual replacement rates in herds B and C were 60% and 50%, respectively. Litters
26 from each farrowing unit were transferred to a separate nursery at 21 doa, and to a

1 finishing unit at 63 doa. The age of slaughtered pigs ranged from 174-184 days among
2 farms. A summary of herds size and pig flows are shown in Figure 1.

3 All replacement gilts were vaccinated for *M. hyopneumoniae* (Porcilis PCV
4 Mhyo®, MSD Saúde Animal, Brazil) at weaning (21 doa) and at 160 doa, when also
5 received a single tulathromycin (Draxxin®, Zoetis, NJ, USA) injection. Upon arrival at
6 the GDU, all gilts received amoxicillin (Farmaxilin 50 Premix®, Farmabase Saúde
7 Animal, São Paulo, Brazil) in feed for 10 days. In farrowing unit A, gilts received another
8 *M. hyopneumoniae* vaccine (Porcilis PCV Mhyo®, MSD Saúde Animal, Brazil) dose at
9 95 days of gestation. Piglets born in all farrowing units were vaccinated for *M.*
10 *hyopneumoniae* (IngelvacMycoflex®, Boeringher Ingelhein, Ingelhein, Germany) at
11 weaning (21 doa). Vaccination protocols, including other pathogens are described in
12 Table 1. Antibiotic treatment protocols were similar between all nursery and finishing
13 units, feed and water antibiotics effective against *M. hyopneumoniae* were allowed during
14 the study as part of farm management, but no injectable antibiotics effective against *M.*
15 *hyopneumoniae* were used throughout the trial.

16

17 *Study design*

18 At each farrowing unit, 80 piglets born from 40 sows (two piglets per sow) were
19 randomly selected and ear tagged at birth for the longitudinal study and no cross fostering
20 was allowed during the lactation period. In farrowing unit A, 80 piglets born to 40
21 primiparous sows were selected, in farrowing unit B piglets were selected from parity
22 order 2-6 sows, and in farrowing unit C piglets were selected from parity order 1-6 sows.

23 Data from dead piglets which lost the ear tag or which could not be sampled at
24 slaughter were removed from the study in all sampling events. Sows that had both piglets

1 removed from the study were also excluded. In the end 33, 34 and 37 sows and 54, 71
2 and 66 pigs were analyzed in herds A, B and C, respectively, during the entire study.

3 All selected sows were sampled for *M. hyopneumoniae* detection by PCR at 0-3
4 days prior to farrowing, and all piglets were sampled for *M. hyopneumoniae* detection by
5 PCR at approximately 21 (weaning), 63 (end of nursery), 100 and 140 doa (finishing
6 phase). Lungs from all animals were collected at slaughter and individually assessed and
7 scored for pneumonic lesions (Madec and Kobisch, 1982) when pigs were 174±10 doa.

8

9 *Sample Collection*

10 Deep tracheal catheters (DTC) were collected in sows 0-3 days prior to farrowing,
11 which was performed by inserting a sterile catheter (post cervical cannula for post cervical
12 artificial insemination used in sows, Minitub®, Tiefenbach, Germany) through the larynx
13 towards the trachea and rubbing against the tracheal wall, with the aid of a mouth gag, a
14 head flashlight and a laryngoscope (Sponhein et al., 2019). Nasal swabs (NS) were
15 collected from piglets at weaning (21 doa) by adding a sterile rayon swab (COPAN®,
16 Murrieta, CA, USA) in both nasal cavities and rotating clockwise and counterclockwise,
17 and DTC were collected from the same pigs at 63, 100 and 140 doa. After collection, the
18 tip of the catheter (covered by tracheal mucus) was stored in a sterile conic tube with 0,5
19 mL phosphate buffered saline (PBS, Laborclin®, Pinhais, Brazil) solution. At slaughter,
20 an affected lung lobe was collected from each animal when lesions were present. If lesions
21 were absent, a random lung lobe was collected. All samples were identified and
22 refrigerated until storage at -20°C at the laboratory for further testing.

23

24 *Lung lesion scoring*

25 Lungs of all animals were individually assessed for pneumonic lesions (purple to
26 gray colored areas of pulmonary consolidation). Each lung lobe was given a score from

1 0 to 4 as described by Madec and Kobisch (1982) as follows: 0) no lesion; 1) lesion
2 affecting less than 25% of the lobe surface; 2) lesion affecting between 26 and 50% of
3 the lobe surface; 3) lesion affecting between 51 and 75% of the lobe surface and 4) lesion
4 affecting more than 75% of the lobe surface. Total lung affected area was then calculated
5 considering each lobe relative volume (Christensen et al., 1999).

6

7 *Sample processing and Mycoplasma hyopneumoniae detection by real-time PCR*

8 Nasal swabs, DTC samples and lung fragments were processed for DNA
9 extraction with PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific®,
10 Waltham, USA) according to the manufacturer instructions. Real time PCR was
11 performed as described by Takeuti et al. (2017a). Reactions were performed in duplicate
12 in a StepOnePlus™ Real Time thermocycler (Applied Biosystems®, Foster City, USA)
13 and two positive and two negative controls were added to each plate. Samples were
14 considered positive for *M. hyopneumoniae* when cycle threshold values (Ct) were ≤ 39.5 .

15

16 *Statistical Analysis*

17 The *M. hyopneumoniae* prevalence was estimated at each sampling moment based
18 on the number of positive pigs for *M. hyopneumoniae* by real-time PCR over the total
19 number of animals sampled in each herd. Multiple pairwise comparison tests of
20 proportions with Bonferroni correction were performed in R v3.2 (The R Foundation for
21 Statistical Computing, Vienna, Austria) to compare the prevalence of *M. hyopneumoniae*
22 by real-time PCR among herds at the same sampling moment. Lung lesion scoring data
23 were analyzed by analysis of variance. and Statistical significance was considered when
24 p-values were less than 0.05.

25

26

1 **Results**

2

3 *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in sows prior to farrowing by real-time PCR

4 The distribution of parity order of sampled sows and the prevalence of *M.*
5 *hyopneumoniae* positive sows by PCR in each farrowing unit are represented in Table 2.

6 No significant difference ($p > 0.05$) was found in *M. hyopneumoniae* sow prevalence
7 among herds prior to farrowing (A: 6.06%; B:10.81% and C:8.82%).

8

9 *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in piglets from weaning to slaughter age by real- 10 time PCR

11 The detection of *M. hyopneumoniae* in piglets by PCR at all sampling events are
12 shown in Figure 2. The prevalence at weaning (21 doa) was statistically different ($p <$
13 0.05) between herds A (20.37%) and B (4.23%), and between herds A and C (7.58%),
14 although no differences were found between herds B and C. Detection of positive piglets
15 decreased at the end of the nursery period (63 doa) and no significant differences were
16 found among herds (A:1.85%; B:0.0% and C:0.0%; $p > 0.05$). On the other hand, at 100
17 doa the prevalence of positive pigs was significantly higher ($p < 0.05$) in herd B (15.49%)
18 when compared to herds A (1.85%) and C (0.0%). At 140 doa the prevalence increased
19 in herd B (71.83%) being significant higher ($p < 0.05$) when compared to herds A (0.0%)
20 and C (1.52%) which remained low. In addition, the percentage of *M. hyopneumoniae*
21 positive lungs at slaughter age was significantly higher ($p < 0.05$) in herd B (A: 27.78%;
22 B: 78.87% and C: 33.33%). A total of 3.7 % of piglets from all herds born to positive
23 sows were detected positive at weaning. In herd B, 1.41% of positive piglets were born
24 to PO1 sows, 1.41% to PO4 sows and 1.41% to PO5 sows. In herd C 3.03% were born to
25 PO1 sows, 3.03% to PO5 sows and 1.52% to PO6 sows.

26

1 *Lung lesion scoring*

2 Not all lungs could be assessed for pneumonic lesions due to losses of lung lobes
3 caused by pleurisy adherences. Also, some animals were slaughtered separately due to
4 other health reasons, such as herniations. A total of 48, 61 and 63 lungs were assessed in
5 herds A, B and C, respectively. Results for lung lesions are presented in Table 3. Presence
6 and severity of enzootic pneumonia-like lung lesions were significantly different among
7 herds. In herd B, pneumonia prevalence and severity were significantly higher ($p < 0.05$)
8 when compared to herds A and C, where 100% of lungs presented pneumonic lesions
9 covering an average of 26.25% of the lungs surface. In herd A, 66.7% of lungs presented
10 pneumonic lesions covering an average of 8.86% of the lungs surface. In herd C, 15.9%
11 of lungs presented pneumonic lesions with an average lesion extension of 1.14%.
12 Additionally, a total of 5.8% of pigs which were *M. hyopneumoniae* positive by PCR at
13 weaning presented lung lesions at slaughter age within all herds included in the study. A
14 proportion of 54.1% of pigs were not detected positive for *M. hyopneumoniae* by PCR at
15 weaning and showed pneumonic lesions at slaughter (data not shown).

16

17 **Discussion**

18 The present study assessed the infection dynamics of *M. hyopneumoniae*
19 longitudinally and evaluated the occurrence and severity of lung lesions at slaughter
20 comparing pigs born in different production systems regarding parity segregation. Piglets
21 were sampled from weaning to slaughter age for *M. hyopneumoniae* detection by PCR
22 and pneumonic lesions were observed and scored at slaughter.

23 *Mycoplasma hyopneumoniae* was detected in all farrowing units at low prevalence
24 in sows prior to farrowing, ranging from 6.06% to 10.81%. Even though studies suggest
25 that prevalence decreases as sow parity order increases (Calsamiglia and Pijoan, 2000),
26 we could not find evident relationship between sow parity order and *M. hyopneumoniae*

1 detection prior to farrowing, as *M. hyopneumoniae* was detected in parity orders 3-5 or
2 2-5 sows at similar rates in farrowing units B and C, respectively. Interestingly,
3 replacement females (PO0 gilts in herd C and PO1 sows in herd B) were not detected
4 positive prior to the first farrowing after being transferred to the farrowing units included
5 in this study. However, these findings should be interpreted carefully due to the low
6 number of sows sampled in each parity order category, which might have underestimated
7 the true prevalence of positive sows. On the other hand, in farrowing unit A which is
8 composed only by gilts, the higher number of females sampled in the same parity order
9 probably increased the probability of detection. Other studies revealed varied results
10 regarding sow prevalence at farrowing. Calsamiglia and Pijoan (2000) detected a
11 prevalence of 25% of sows positive for *M. hyopneumoniae* at farrowing regardless parity
12 order. Pieters et al. (2014) observed that prevalence of *M. hyopneumoniae* detection in
13 different parity order sows at weaning ranged from 0-48%, and Takeuti et al. (2017b)
14 found a 0-15.7% prevalence in self-replacement gilts prior to farrowing or during the
15 lactation period.

16 In this context, parity segregation could be used as an alternative to control *M.*
17 *hyopneumoniae* infections. Segregating gilts from multiparous sows until their first
18 farrowing would provide enough time for gilts to become infected, recover and stop
19 shedding *M. hyopneumoniae* before being transferred to the multiparous sow herd (Maes
20 et al., 2008). However, this pattern was not observed in our study. It was expected that
21 the detection of *M. hyopneumoniae* in sows would be higher in herd A (PO1) and
22 prevalence would be lower in herd B (\geq PO2). The lack of a proper acclimation
23 management is one factor that might have contributed to these results. It is hypothesized
24 that the absence of a prior exposure of young gilts could have induced the presence of
25 negative subpopulations of sows over time making them susceptible to future infections

1 regardless the parity order. *M. hyopneumoniae* negative subpopulations were previously
2 described by Takeuti et al. (2017a), where 18.2% of naturally infected gilts did not
3 become positive at any sampling moment from 0 to 358 doa. In our study, sows were
4 sampled once in a cross-sectional pattern, which might have limited the understanding of
5 the infection dynamics in these farrowing units. Although our results suggest no effect of
6 segregating gilts on *M. hyopneumoniae* colonization, assumptions regarding infection
7 dynamics in sows should be taken carefully. Nevertheless, even in parity segregated
8 systems early exposure to pathogens is critical. An inefficient pathogen exposure allows
9 the introduction of naïve animals and poses a risk of infection to the recipient herd
10 (Moore, 2005).

11 One factor that might have also contributed to the detection of negative gilts was
12 the administration of a single tulathromycin injection at 160 doa, which could have
13 destabilized the herd and made gilts susceptible to a future infection. It is already reported
14 that a single tulathromycin administration at 112 days of gestation reduced sow shedding
15 and the number of positive sows at farrowing and weaning (Holst et al., 2014).

16 Other factors affecting sow colonization could be related to replacement rates and
17 movement of sows. Parity segregation increases the number of movements of sows,
18 increasing the risk of contamination (Moore, 2005). Moreover, high replacement rates
19 have been described to increase occurrence of enzootic pneumonia (Nathues et al., 2013)
20 and seroprevalence for *M. hyopneumoniae* in sows (Fano and Pijoan, 2006). Since
21 farrowing unit A is composed only by gilts, these animals are housed for a shorter period
22 when compared to conventional herds and replacement rates reach 100% over the year.
23 Also, females are constantly introduced and removed from this herd on a weekly basis.
24 On the other hand, in farrowing units B and C, replacement rates are similar to those
25 usually practiced in conventional farms.

1 Low to moderate detection of *M. hyopneumoniae* by PCR was observed in piglets
2 at weaning in all herds, ranging from 4.23% to 20.37%. Other studies revealed varied
3 results in piglets at this age. Low prevalence of positive piglets has been reported, ranging
4 from 1.5 to 3.8% by nested-PCR in nasal swabs (Sibila et al., 2006). On the other hand,
5 high detection of positive piglets was observed, ranging from 36.7% (Villarreal et al.,
6 2010) to 51.28% (Fano et al., 2007) in nasal swabs by nested PCR. A higher detection of
7 positive piglets was observed in herd A, which is composed only by gilts and PO1 sows.
8 These findings are in accordance with those found by Fano et al. (2006) where prevalence
9 of positive piglets was higher in piglets born to young sows, although some studies did
10 not observe effect of dam parity order on piglet prevalence at weaning (Calsamiglia and
11 Pijoan, 2000; Pieters et al., 2014). It is assumed that prevalence at weaning is mainly
12 explained by vertical transmission during the lactation period (Fano et al., 2006). Sow-
13 to-piglet transmission was observed in 3.7% of piglets in our study. In fact, dam PCR
14 status for *M. hyopneumoniae* is positively correlated to piglet PCR status at weaning
15 (Pieters et al., 2014), although some studies did not detect transmission from sow to piglet
16 by real-time PCR using laryngeal swabs (Takeuti et al., 2017b).

17 Prevalence of positive piglets for *M. hyopneumoniae* decreased to 0.0-1,85% at
18 the end of the nursery period (63 doa) in all herds. In herds A and C it remained at low
19 levels from 100 doa until slaughter when it reached 27.78% and 33.33% respectively.
20 However, in herd B the prevalence was significantly higher at 100 doa (15.49%), at 140
21 doa (71.83%) and at slaughter age (78.87%) when compared to piglets from herds A and
22 C. The low prevalence found throughout the study in herds A and C can be explained by
23 the low transmission rate (Meyns et al., 2004) and the persistence of infection for long
24 periods (Pieters et al., 2009). Another factor that might have reduced prevalence of
25 positive piglets born in farrowing unit A is the vaccination of gilts at 95 days of gestation.

1 It has been reported that vaccination of sows during gestation reduces piglet colonization
2 at weaning and occurrence of lung lesions (Arsenakis et al., 2019). On the other hand, the
3 increased prevalence in herd B might be due to differences in health challenges among
4 the herds of this study. Herd sizes are larger in all units of herd B (farrowing unit, nursery
5 and finishing unit), which may be a risk factor to the spread of respiratory pathogens
6 (Maes et al., 2000). In fact, herd sizes are approximately three times larger in herd B when
7 compared to herds A and C.

8 At slaughter, occurrence of enzootic pneumonia like lung lesions ranged from
9 15.9 to 100% and the average lung lesion extension varied from 1.14 to 26.25%. Pigs
10 from herd B presented the highest prevalence and most severe lung lesions when
11 compared to pigs from herds A and C, which might be explained by the high prevalence
12 of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in the finishing phase, on the contrary of the
13 findings reported by Moore (2005), where a threefold reduction of lung lesions was
14 observed in the progeny born to the farrowing unit with no gilts. Prevalence and severity
15 of pneumonic lesions have been reported to be predicted by piglet prevalence by PCR at
16 weaning (Fano et al., 2007). However, in the present study only 5.8% of piglets that were
17 positive for *M. hyopneumoniae* by PCR at weaning presented lung lesions at slaughter
18 The majority (54.1%) of piglets was negative at weaning and presented lung lesions,
19 which could be explained by predominance of infections occurring during the finishing
20 period, which often occurs in multisite production systems (Sibila et al., 2004; Giacomini
21 et al., 2016).

22 It must be considered that sample types were different during the study. Nasal
23 swabs were used in piglets at 21 doa due to the difficulty of collecting deeper samples at
24 this age, and the high detection of positive piglets described in other studies (Fano et al.,
25 2007; Villarreal et al., 2010). Currently it is known that the most sensitive sample types

1 *in vivo* are obtained from the lower respiratory tract (trachea and bronchi) (Sponheim et
2 al., 2019), which were collected in sows and pigs from 63 to 140 doa in our study. The
3 collection of nasal swabs might have led to the detection of false-positive piglets at
4 weaning. In addition, lung samples showed an increase in the detection of positive piglets
5 by PCR.

6

7 **Conclusions**

8 Based in our results, parity segregation alone was not effective in controlling *M.*
9 *hyopneumoniae* infection and lung lesions at slaughter, since detection of positive piglets
10 and occurrence of pneumonic lesions in the herd with no gilts were higher than the herd
11 composed only by gilts and the conventional herd. Several factors might have influenced
12 these results, such as differences in herd sizes and management, health status and
13 vaccination protocols. However, it is hypothesized that the lack of a proper acclimation
14 management in gilts might have contributed to the presence of naïve primiparous sows
15 being introduced to the recipient herd.

16

17 **Competing interests**

18 The authors declare that they have no competing interest.

19

20 **Acknowledgements**

21 This project was funded by CAPES and FUNDESA. The authors acknowledge
22 Master Agroindustry (Videira, Santa Catarina, Brazil) for providing the farms and the
23 assistance of farms employees.

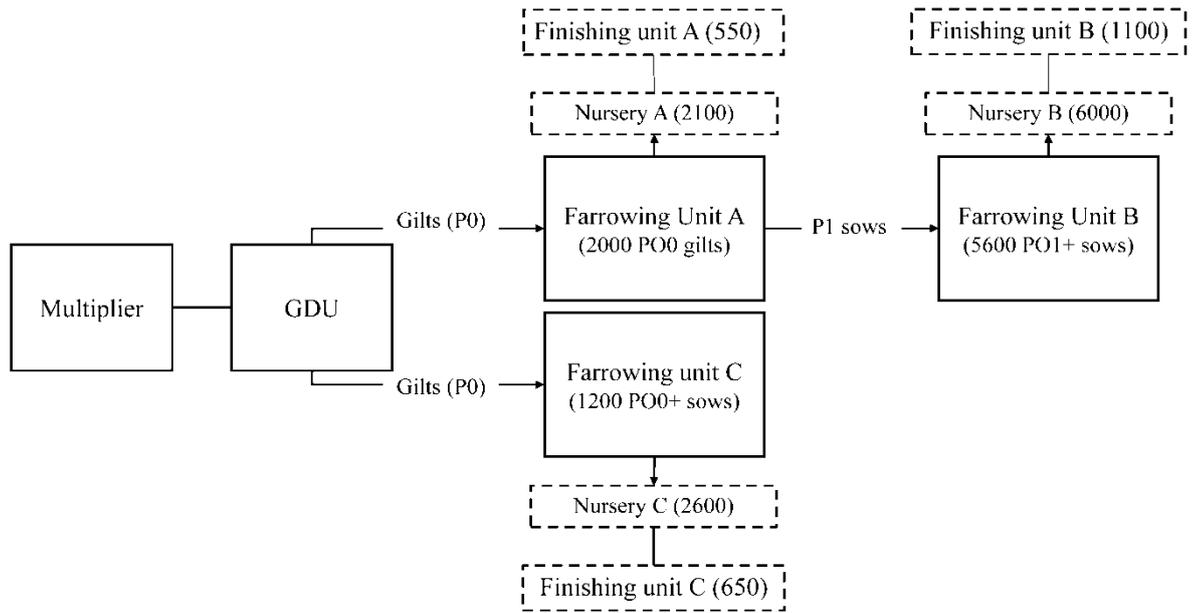
1 **References**

- 2 Arsenakis, I., Michiels, A., Schagemann, G., Gomez-Duran, C.O., Boyen, F.,
3 Haesebrouck, F., Maes, D.G.D., 2019. Effects of pre-farrowing sow vaccination against
4 *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. *Vet. Rec.* 184,
5 222.
- 6 Brandt, G., 2007. Logística na produção de suínos ameaça ou oportunidade, in: XIII
7 Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas Em Suínos – ABRAVES.
8 Florianópolis, Brasil, p. 87.
- 9 Calsamiglia, M., Pijoan, C., 2000. Colonisation state and colostral immunity to
10 *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet. Rec.* 146, 530–532.
- 11 Christensen, G., Sørensen, V., Mousing, J., Straw, B.E., D’Allaire, S., Mengeling, W.L.,
12 Taylor, D.J., 1999. Diseases of the respiratory system, in: *Diseases of Swine*. Iowa State
13 University Press.
- 14 Fano, E., Pijoan, C., 2006. Assessing the *Mycoplasma hyopneumoniae* infection pattern
15 in a sow herd following an increase in the replacement rate. In Allen D. Lemans Swine
16 Conference. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy,
17 <http://hdl.handle.net/11299/157157>.
- 18 Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Dynamics and persistence of *Mycoplasma*
19 *hyopneumoniae* infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 69, 223–228.
- 20 Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J., 2007. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae*
21 colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Can. J. Vet. Res.* 71, 195–
22 200.
- 23 Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Torremorell, M., 2006. Assessment of the effect of sow
24 parity on the prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets at weaning, in:
25 *Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress*.

- 1 Furtado, C.S.D., Kummer, R., Wentz, I., Bortolozzo, F.P., 2006. Origem das leitoas de
2 reposição, in: Bortolozzo, F.P., Wentz, I., Bernardi, M.L., Kummer, R., Amaral Filha,
3 W.S., Mellagi, A.P.G., Furtado, C.S.D. (Eds.), Suinocultura Em Ação: A Fêmea Suína de
4 Reposição. Pallotti, Porto Alegre. pp. 23–33.
- 5 Gadd, J., 2011. Parity Segregation, in: Modern Pig Production Technology. Nottingham
6 University Press, Nottingham, United Kingdom, 467–474.
- 7 Giacomini, E., Ferrari, N., Pitozzi, A., Remistani, M., Giardiello, D., Maes, D., Alborali,
8 G.L., 2016. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* seroconversion and infection in
9 pigs in the three main production systems. Vet. Res. Commun. 40, 81–88.
- 10 Holst, S., Yeske, P., Leuwerke, B., Swalla, R., Davies, P., Pieters, M. 2013. Effect of pre-
11 farrow administration of tulathromycin injectable solution on *Mycoplasma*
12 *hyopneumoniae* prevalence in suckling pigs at birth and weaning. AASV Annual
13 Meeting. San Diego, CA.
- 14 Madec, F., Kobisch, M., 1982. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à
15 l'abattoir. Journées la Rech. Porc. 14.
- 16 Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., De Kruif, A.,
17 2000. Herd factors associated with the seroprevalences of four major respiratory
18 pathogens in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. Vet. Res. 31, 313–327.
- 19 Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. Control
20 of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet. Microbiol. 126, 297–309.
- 21 Maes, D., Sibila, M., Kuhnert, P., Segales, J., Haesebrouck, F., Pieters, M., 2018. Update
22 on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease
23 control. Transbound. Emerg Dis/65 Suppl 1, 110–124.
- 24 Meyns, T., Maes, D., Dewulf, J., Vicca, J., Haesebrouck, F., de Kruif, A., 2004.
25 Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using

- 1 transmission experiments. *Prev. Vet. Med.* 66, 265–275.
- 2 Moore, C., 2005. Parity Segregation, in: Murphy, J.M. (Ed.), 5th London Swine
3 Conference. London, Ontario, Canada, pp. 61–67.
- 4 Nathues, H., Woeste, H., Doehring, S., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., Beilage, E., 2013.
5 Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at
6 the age of weaning. *Acta Vet. Scand.* 55, 30.
- 7 Pieters, M., Cline, G.S., Payne, B.J., Prado, C., Ertl, J.R., Rendahl, A.K., 2014. Intra-farm
8 risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. *Vet. Microbiol.*
9 172, 575–580.
- 10 Pieters, M., Fano, E., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. *Vet. Rec.*
11 178, 122–123.
- 12 Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of
13 *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs.
14 *Vet. Microbiol.* 134, 261–266.
- 15 Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, Á., Jensen, J.C., 2004.
16 Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production
17 systems. *Can. J. Vet. Res.* 68, 12.
- 18 Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segales, J., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia,
19 M., 2006. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling
20 pigs. *Vet. Microbiol.* 121, 352–356.
- 21 Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segales, J., 2009. Current
22 perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae*
23 infection. *Vet. J.* 181, 221–231.
- 24 Sponheim, A., Alvarez, J., Fano, E., Schmaling, E., Dee, S., Hanson, D., Wetzell, T.,
25 Pieters, M., 2019. Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal

- 1 catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally
2 infected pigs early and late after infection. *Vet. Microbiol.* 108:500.
- 3 Takeuti, K.L., Barcellos, D.E.S.N., Andrade, C.P., Almeida, L.L., Pieters, M., 2017a.
4 Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-
5 replacement gilts. *Vet. Microbiol.* 208, 18–24.
- 6 Takeuti, K.L., Barcellos, D.E.S.N., de Lara, A.C., Kunrath, C.F., Pieters, M., 2017b.
7 Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Vet.*
8 *Microbiol.* 203, 215–220.
- 9 Villarreal, I., Vranckx, K., Duchateau, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Jensen, J.C.,
10 Nanjiani, I.A., Maes, D., 2010. Early *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in European
11 suckling pigs in herds with respiratory problems: Detection rate and risk factors. *Vet.*
12 *Med. (Praha).* 55, 318–324.
- 13 Vranckx, K., Maes, D., Calus, D., Villarreal, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2011.
14 Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for
15 differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *J. Clin.*
16 *Microbiol.* 49, 2020–2023.



1

2 Figure 1. Herd sizes and pig flows of each production system included in the study. Herd size is
 3 shown between parenthesis. GDU: gilt development unit, PO0: parity order zero representing
 4 gilts, PO1: parity order one sows.

1 Table 1. Summary of vaccination protocols used in the herds.

	Age (days)					
Gilts	<i>21</i>	<i>55-75</i>	<i>160</i>	<i>170-185</i>		
Multiplier	PCV2+Mhyo ^a	APP ^b	PCV2+Mhyo ^a	-	-	-
GDU	-	-	-	Reproductive ^c	AR ^d	
FU	<i>75-95 days of gestation</i>					<i>10 days after farrowing</i>
A	Enteric A ^e	Enteric B ^f	HPS+Pm ^g	AR ^d	PCV2+Mhyo ^a	Reproductive ^c
B	Enteric A ^e	Enteric B ^f	HPS+Pm ^g	AR ^d	-	Reproductive ^c
C	Enteric A ^e	Enteric B ^f	-	AR ^d	-	Reproductive ^c
Offspring	<i>21 days of age</i>					
A	PCV2+Mhyo ^h			-		
B	PCV2+Mhyo ^h			HPS+Pm ^g		
C	PCV2+Mhyo ^h			-		

2 GDU – Gilt development unit, FU – Farrowing unit.

3 ^a Porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Porcilis® PCV Mhyo, MSD Saúde
4 Animal, Brazil). ^b *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Coglapix®, Ceva, France); ^c Porcine
5 parvovirus and Leptospirosis (Eryseng® Parvo Lepto, Hipra, Spain); ^d Atrophic rhinitis
6 (Porcilis® ART, MSD Saúde Animal, Brazil); ^e *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*
7 (Autogenous vaccine, Microvet, Brazil); ^f *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and
8 *Clostridium difficile* (Serkel Gastro® RV, Vencofarma, Brazil); ^g *Haemophilus parasuis* and
9 *Pasteurella multocida* (Autogenous vaccine, Microvet, Brazil); ^h Porcine circovirus type 2 and
10 *Mycoplasma hyopneumoniae* (Ingelvac Mycoflex®, Boeringher Ingelhein, Germany).

- 1 Table 2. Distribution and prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* positive sows by
- 2 PCR regarding different parity orders within the three herds.

Farrowing unit	Parity	Sampled sows (n)	Positive/tested (%)
A	1	33	2/33 (6.06)
	2	7	0/37 (0.0)
	3	11	1/37 (2.70)
	4	9	2/37 (5.41)
B	5	5	1/37 (2.70)
	6	5	0/37 (0.00)
	Total	37	4/37 (10.81)
C	1	8	0/34 (0.00)
	2	7	1/34 (2.94)
	3	7	1/34 (2.94)
	4	4	0/34 (0.00)
	5	6	1/34 (2.94)
	6	2	0/34 (0.00)
	Total	34	3/34 (8.82)

3

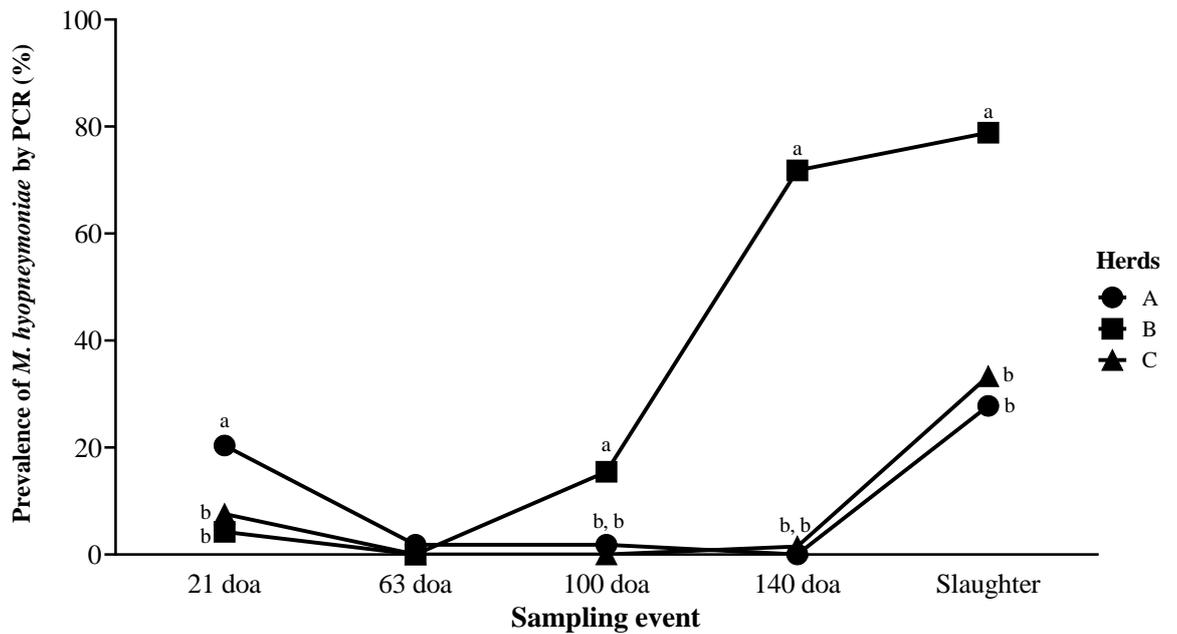
1 Table 3. Prevalence and extension of pneumonic lesions in pigs within three different
2 herds.

Herd*	n	Slaughter age (days)	Frequency of pneumonic lesions (%)	Lung lesion extension (%)				
				Mean	Min	Max	SD	Score
A	48	184	66.7 ^b	8.86 ^b	0.00	49.00 ^b	±11.65	1.17
B	61	177	100.0 ^a	26.25 ^a	1.50	60.75 ^a	±15.69	2.90
C	63	174	15.9 ^c	1.14 ^c	0.00	25.00 ^c	±3.83	0.21

3 Min: minimum, Max: maximum, SD: Standard deviation

4 ^{a, b, c} Different superscript letters within a column indicate significant statistical difference (p <
5 0.05).

6 *Herd A represents the pigs born in farrowing unit A (herd composed only by gilts and
7 primiparous sows); herd B represents the pigs born in farrowing unit B (parity order ≥ 2 sows);
8 herd C represents the pigs born in farrowing unit C (herd composed by gilts and older parity order
9 sows).



1

2 Figure 2. *Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence by PCR in piglets from weaning to
 3 slaughter within three different herds. Herd A represents the piglets born in farrowing
 4 unit A (herd composed only by gilts and primiparous sows); herd B represents the piglets
 5 born in farrowing unit B (parity order ≥ 2 sows); herd C represents the piglets born in
 6 farrowing unit C (herd composed by gilts and older parity order sows).

7 ^{a,b} Different letters above symbols indicate significative statistical difference ($p < 0.05$)
 8 among herds within the same sampling moment.

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que não houve benefício da parição segregada em diminuir a transmissão de *M. hyopneumoniae*, uma vez que na granja que recebe as primíparas do quinto sítio a prevalência nos leitões dos 100 dias de idade ao abate, bem como a ocorrência e severidade das lesões pulmonares foram maiores. Diversos fatores podem ter influenciado para a ocorrência deste comportamento, como diferenças no desafio sanitário entre as granjas, tamanho dos planteis, manejo sanitário e outras características individuais, mas a principal hipótese é de que a falta de aclimação das leitoas na origem tenha possibilitado a presença de subpopulações susceptíveis ao longo do tempo, perpetuando a circulação do agente ao longo do sistema produtivo independentemente da ordem de parto das matrizes. Entretanto, seria necessário avaliar a hipótese de que se fossem combinadas a parição segregada com uma adequada aclimação das leitoas a utilização desse sistema poderia ser efetiva em controlar as infecções por *M. hyopneumoniae*.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Relatório Anual 2019**. Associação Brasileira de Proteína Animal, São Paulo, SP, 2019.
- ADAMS, C.; PITZER, J.; & MINION, F. C. In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7784–7787, 2005.
- AMASS, S. F.; & BAYSINGER, A. Swine diseases transmission and prevention. In: STRAW, B. E. et al. (Eds.). **Diseases of Swine**. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2006. p. 1075–1098.
- ARSENAKIS, I. et al. Effects of pre-farrowing sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. **Veterinary Record**, v. 184, n. 7, p. 222, 2019.
- BALESTRIN, E. et al. Clonality of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine farms from Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 238, p. 108434, 1 nov. 2019.
- BATISTA, L. et al. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. **Journal of Swine Health and Production**, v. 12, n. 2, p. 75–77, 2004.
- BETLACH, A. M. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: Current trends and proposed terminology for genomic classification. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 5, p. 1840–1854, 2019.
- BLANCHARD, B. et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 329–341, 1992.
- BOYD, R. D.; WILLIAMS, N.; & ALLEE, G. L. **Segregated parity structure in sow farms to capture nutrition, management and health opportunities**. Midwest Swine Nutrition Conference. **Anais...**Indianapolis, IN: 2008
- BRANDT, G. **Logística na produção de suínos ameaça ou oportunidade**. XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES. **Anais...**Florianópolis, Brasil: 2007
- BRANDT, G. Quarto Sítio seria a melhor solução para incorporação de matrizes de reposição em um rebanho suíno. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. Supl 1, p. s137–s142, 2008.
- CALSAMIGLIA, M.; & PIJOAN, C. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. **Veterinary Record**, v. 146, n. 18, p. 530–532, 2000.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; & TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 3, p. 246–251, 1999.
- CALUS, D. et al. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing

units assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 3, p. 335–340, 2010.

CARUSO, J. P.; & ROSS, R. F. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 227–231, 1990.

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

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

DALLA COSTA, O. A. et al. Fatores de risco associados à rinite atrófica progressiva e a pneumonias crônicas nas fases de crescimento e terminação. **Embrapa Suínos e Aves- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2000.

DEBEY, M. C.; & ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5312–5318, 1994.

DEE, S.; OTAKE, S.; & DEEN, J. Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. **Virus Research**, v. 154, n. 1–2, p. 177–184, 2010.

DEENEY, A. S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades phagocytic uptake by porcine alveolar macrophages in vitro. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 51, 2019.

DOS SANTOS, J. L. et al. Micoplasmoses. In: SOBESTIANSKY, J.; & BARCELLOS, D. E. N. (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cânone editorial, 2012. p. 216–226.

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

DUBOSSON, C. R. et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1–2, p. 55–65, 2004.

ERLANDSON, K. R. et al. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v. 13, n. 4, p. 198–203, 2005.

FABLET, C. et al. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2–4, p. 238–245, 2010.

FANO, E. et al. Assessment of the effect of sow parity on the prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets at weaning. Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress. **Anais...2006**

- FANO, E. et al. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 3, p. 195–200, 2007.
- FANO, E.; PIJOAN, C.; & DEE, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 3, p. 223–228, 2005.
- FERRARINI, M. G. et al. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 683–696, 1 jun. 2018.
- FERRARINI, M. G. et al. Insights on the virulence of swine respiratory tract *mycoplasmas* through genome-scale metabolic modeling. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 353, 2016.
- FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 27, n. 6, p. 337–339, 1975.
- FURTADO, C. S. D. et al. Origem das leitoas de reposição. In: BORTOLOZZO, F. P. et al. (Eds.). . **Suinocultura em ação: A fêmea suína de reposição**. Pallotti, Porto Alegre. [s.l: s.n.]. 2006. p. 23–33.
- GADD, J. Parity Segregation. In: **Modern Pig Production Technology**. Nottingham, United Kingdom: Nottingham University Press, 2011. p. 467–474.
- GARCIA-MORANTE, B. et al. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 154, n. 2–3, p. 125–134, 2016.
- GARCIA-MORANTE, B. et al. Determinants for swine mycoplasmal pneumonia reproduction under experimental conditions: A systematic review and recursive partitioning analysis. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181194, 2017b.
- GARCIA-MORANTE, B. et al. Potential use of local and systemic humoral immune response parameters to forecast *Mycoplasma hyopneumoniae* associated lung lesions. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175034, 2017a.
- GARCIA-MORANTE, B.; SIBILA, M.; & SEGALÉS, J. **Moving towards an improved experimental model for reproduction of pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae***. Tese de Doutorado. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona, 2017c.
- GARZA-MORENO, L. et al. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 219, p. 23–29, 2018.
- GARZA-MORENO, L. et al. Comparison of vaccination protocols against *Mycoplasma hyopneumoniae* during the gilt acclimation period. **Veterinary Microbiology**, v. 229, p. 7–13, 2019.
- GONZAGA, N. F. et al. Antimicrobial susceptibility and genetic profile of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019.

GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P.; & WHITTLES, P. Production of Enzootic Pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*. **Veterinary Record**, v. 77, n. 42, p. 1247-, 1965.

HENTHORN, C. R.; MINION, F. C.; & SAHIN, O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbiology**, v. 164, n. 11, p. 1394–1404, 2018.

HOLST, S.; YESKE, P.; & PIETERS, M. Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed-to-wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure and medication. **Journal of Swine Health and Production**, v. 23, n. 6, p. 321–330, 2015.

HSU, T.; & MINION, F. C. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Gene**, v. 214, n. 1–2, p. 13–23, 1998.

KNOX, R. **Getting to 30 pigs weaned/sow/year**. Proceedings of London Swine Conference. **Proceedings...2005**

KURTH, K. T. et al. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 463–469, 2002.

KWON, D.; CHOI, C.; & CHAE, C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 584–587, 2002.

LE CARROU, J. et al. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1959–1966, 2006.

LIU, W. et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 4, p. 1016–1017, 2011.

LIU, W. et al. Surface proteins mhp390 (P68) contributes to cilium adherence and mediates inflammation and apoptosis in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 92–100, 2019.

LORENZO, H. et al. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3–4, p. 199–207, 2006.

MACHADO, G.; & DALLANORA, D. Evolução histórica dos sistemas de produção de suínos. In: SUÍNOS, A. B. DE C. DE (Ed.). **Produção de Suínos: teoria e prática**. Brasília, DF: [s.n.]. 2014. p. 95–98.

MAES, D. et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 297–309, 2008.

MAES, D. et al. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65 Suppl 1, p. 110–124, 2018.

MAES, D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: update on epidemiology and control. 21st International Pig Veterinary Society Congress. **Anais...Vancouver, Canada: 2010**

- MAES, D.; PASMANS, F.; & HAESEBROUCK, F. Porcine *Mycoplasmas*: the never ending story. 5th Asian Pig Veterinary Society Congress. **Proceedings...**Pattaya, Thailand: 2011
- MARCHIORO, S. B. et al. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. **Vaccine**, v. 31, n. 9, p. 1305–1311, 2013.
- MARÉ, C. J.; & SWITZER, W. P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae* a causative agent of virus pig pneumonia. **Veterinary Medicine**, v. 841, 1965.
- MAROIS, C. et al. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1523–1533, 2010.
- MAROIS, C. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 96–104, 2007.
- MELLAGI, A. P. G. et al. Estratégias de manejo alimentar na fase pré-cobertura de nulíparas e múltiparas. In: BORTOLOZZO, F. P. et al. (Eds.). **Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos IV**. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2019. p. 53–63.
- MEYNS, T. et al. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 66, n. 1–4, p. 265–275, 2004.
- MICHIELS, A. et al. Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 2, 2017.
- MINION, F. C. et al. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7123–7133, 2004.
- MOORE, C. Parity Segregation. (J. M. Murphy, Ed.)5th London Swine Conference. **Annals...**London, Ontario, Canada: 2005
- 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.
- MUNETTA, Y. et al. IL-18 expression in pigs following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 26, n. 9, p. 637–644, 2006.
- MUNETTA, Y. et al. Porcine TLR2 and TLR6: Identification and their involvement in *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 23, n. 10, p. 583–590, 2003.
- NICKEL, M.; TOO HILL, E.; & LEHMAN, J. Use of a hurricane fogger for *Mycoplasma hyopneumoniae* inoculation in nursery age gilts. 49th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. **Proceedings...**2018

NICOLAIEWSKY, S. et al. Sistemas de produção de suínos. In: SOBESTIANSKY, J. et al. (Eds.). . **Suinocultura Intensiva**. Concórdia, SC: Embrapa, 1998. p. 11–26.

OTAKE, S. et al. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 198–208, 2010.

PARK, S. C. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2502–2506, 2002.

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

PIETERS, M. et al. An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 2, p. 157–160, 2010.

PIETERS, M. G.; & MAES, D. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. et al. (Eds.). . **Diseases of Swine**. 11. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2019. p. 863–883.

PIETERS, M. ***Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence at weaning: What do we know (and do not know) about it?**. 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11299/139367>>.

PIETERS, M.; & FANO, E. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. **Veterinary Record**, v. 178, n. 5, p. 122–123, 2016.

PIETERS, M.; & SIBILA, M. When is the best time to vaccinate piglets against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Record**, v. 181, n. 1, p. 16–17, 2017.

PIETERS, M.; DANIELS, J.; & ROVIRA, A. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 103–109, 2017.

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** (E.-C. Documentos, Ed.), 1991.

PIFFER, I. A.; & ROSS, R. F. Immunofluorescence technique for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine lungs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 8, p. 877–882, 1985.

PIJOAN, C. Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in different parity sows as a preliminary tool for eradication. **Research Report: Swine Health**, v. 2, p. 1–5, 2003.

QUINN, P. J. et al. The mycoplasmas (class: Mollicutes). In: QUINN, P. J. et al. (Eds.). . **Clinical Veterinary Microbiology**. . London: Mosby International Limited, 1994. p. 320–326.

RAYMOND, B. B. A. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17697, 2018.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of

mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

REDONDO, E. et al. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, n. 4, p. 260–270, 2009.

REOLON, L. A. et al. Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112596, 2014.

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

ROSE, D. L.; TULLY, J. G.; & WITTLER, R. G. Taxonomy of some swine Mycoplasmas – *Mycoplasma suis pneumoniae* Goodwin Et Al 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mare and Switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* Meyling and Friis 1972. **International Journal of Systematic Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 83–91, 1979.

ROSS, R. F.; & WHITTLESTONE, P. Recovery of identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: **Methods in Mycoplasmaology**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 115–127.

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, n. 4, p. 395–404, 2003.

SCHEIDT, A. B. et al. The effect of all-in-all-out growing-finishing on the health of pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 3, n. 5, p. 202–205, 1995.

SEYMOUR, L. M. et al. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33971–33978, 2010.

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

SIBILA, M. et al. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3–4, p. 352–356, 2006.

SILVA, G. S. et al. Benefit-cost analysis to estimate the payback time and the economic value of two *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination methods in breeding herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 168, p. 95–102, 2019.

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

SIQUEIRA, F. M. et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 175, 2013.

SOBESTIANSKY, J.; & BARCELLOS, D. E. S. N. Monitoramentos clínicos. In: SOBESTIANSKY, J.; & BARCELLOS, D. E. S. N (Eds.). **Doenças dos Suínos**. 2. ed. Goiânia: Cãnone editorial, 2012. p. 889–892.

SØRENSEN, V. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. **Veterinary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 23–34, 1997.

STARK, K. D. C.; KELLER, H.; & EGGENBERGER, E. Risk-factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. **Veterinary Record**, v. 131, n. 23, p. 532–535, 1992.

STARK, K. D. C.; NICOLET, J.; & FREY, J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 543–548, 1998.

STEMKE, G. W.; & ROBERTSON, J. A. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 959–961, 1982.

STRASSER, M. et al. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 31, n. 1–2, p. 141–153, 1992.

TACCHI, J. L. et al. Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Open Biology**, v. 6, n. 2, p. 150210, 2016.

TAJIMA, M.; & YAGIHASHI, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron-microscopy. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 3, p. 1162–1169, 1982.

TAKEUTI, K. L. et al. Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em swabs laríngeos e muco traqueobrônquico através de PCR em tempo real. (F. P. Bortolozzo et al., Eds.)XII Simpósio Internacional de Suinocultura. **Anais...Porto Alegre**: 2019

TAKEUTI, K. L. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 215-220, 2017a.

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

TAKEUTI, K. L. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in nylon-flocked and rayon-bud swabs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 118–120, 2017c.

TAKEUTI, K. L.; & BARCELLOS, D. E. S. N. O que há de novo sobre a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. In: BARCELLOS, D. E. S. N. et al. (Eds.). **Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos II**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

TAKEUTI, K. L.; BARCELLOS, D. E. S. N.; & BORTOLOZZO, F. P. Adaptação de leitões como ferramenta para redução do impacto da pneumonia enzoótica Suína. In: **Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos III**. Porto Alegre. 2018. p. 89.

TAO, Y. et al. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 144–152, 2019.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 317–320, 2004.

THACKER, E. L.; & MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). . **Diseases of Swine**. 10. ed. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 779–797.

VANGROENWEGHE, F. et al. Assessment of litter prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in preweaned piglets utilizing an antemortem tracheobronchial mucus collection technique and a real-time polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 5, p. 606–610, 2015.

VANGROENWEGHE, F. et al. Confirmation of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a breeding herd through tracheobronchial swab sampling and PCR. **Veterinary Record**, v. 183, n. 10, p. 325, 2018.

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

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

VILLARREAL, I. et al. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 48–52, 2011.

VRANCKX, K. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* diversity in pigs. Tese de Doutorado. Ghent: Ghent University, 2011.

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