



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

“ALTERNATIVAS DE CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Mycoplasma hyopneumoniae*
EM SUÍNOS”

RICARDO YUITI NAGAE

PORTO ALEGRE

2023



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

“ALTERNATIVAS DE CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Mycoplasma hyopneumoniae*
EM SUINOS”

Autor: Ricardo Yuiti Nagae

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos
Neves de Barcellos

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Nagae, Ricardo Yuiti

Alternativas de controle da infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos / Ricardo Yuiti Nagae. -- 2023.

96 f.

Orientador: David Emilio Santos Neves de Barcellos.

Coorientadores: Karine Ludwig Takeuti, Rafael da Rosa Ulguim.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2. Aclimatação de leitões. 3. Nebulização inóculo. 4. Alternativa ao antimicrobiano. 5. Mistura de origens. I. Barcellos, David Emilio Santos Neves de, orient. II. Takeuti, Karine Ludwig, coorient. III. Ulguim, Rafael da Rosa, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Projeto de Pesquisa

Título: “Alternativas de Controle da Infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* em Suínos”

Executor: Ricardo Yuiti Nagae

Orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

Co-orientadores: Profa. Dra. Karine Ludwig Takeuti, Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo e Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim

Defesa da tese defendida em 24 de março de 2023, em banca composta por:

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Roberto Maurício Guedes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Gustavo de Sousa e Silva
Membro da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Mellagi
Membro da Comissão

Porto Alegre, 24 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde e força de vontade para iniciar e concluir um sonho.

À minha família pelo apoio, incentivo, paciência e compreensão da minha ausência em inúmeros momentos da vida de cada um. Emy, Luquinhas e Laurinha vocês são meus pilares de sustentação. À minha mãe Nair que sempre apoiou nos meus estudos.

À minha super amiga Anne pela parceria, nos momentos de alegria como nos cafés da rodoviária e em especial pelo incentivo e apoio nos momentos em que tive dúvidas na continuidade, obrigado Anne.

À Seara Alimentos por proporcionar a realização desta pós-graduação no modelo profissional, por apoiar a realização nesta universidade e em especial no Setor de Suínos e por financiar todos os experimentos realizados neste projeto.

À todos os colegas da Seara que participaram dos experimentos e que tornaram real este projeto: Mario Sergio Assayag Junior, Jose Antônio Ribas, Jonatas Wolf por autorizarem o estudo; Anelcir, Anderson, Camila, Carla, Cintia, Janier, Luisa, Michelleto, Neimar, Poerch e todos os demais colegas de campo por auxiliarem nas granjas; João Zuffo, Mariana, Tais e demais colegas do laboratório por auxiliarem no preparo dos materiais e análises laboratoriais.

À UFRGS e em especial ao Setor de Suínos onde tive a oportunidade de realizar um aperfeiçoamento em 1997 e agora a grande gratidão de realizar este projeto com professores renomados e reviver com todos os colegas do setor o significado de estar presente na comunidade científico-acadêmica. Aos meus mestres professores Ana Paula e Fernando pelos ensinamentos e orientações. Aos profs. Karine e Rafael pelos ensinamentos e conduções das avaliações, análises estatísticas, escrita dos artigos e pela paciência. Aos colegas do Setor pela amizade e por proporcionarem a visão de uma nova geração. Levo com muito orgulho o nome do Setor na vida profissional.

Ao meu grande orientador prof. David Barcellos por me aceitar como orientado, pelos ensinamentos e paciência antes e durante o período do Doutorado e certamente pela “espetacular” aula de humildade que levarei como um grande ensinamento de vida.

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) é o agente causador da Pneumonia Enzoótica, responsável por perdas econômicas significativas no sistema de produção de suínos. O objetivo desta tese foi gerar informações e desenvolver estratégias para o controle de *M. hyopneumoniae* em um sistema de produção de suínos. Três estudos foram realizados para atingir este objetivo. O primeiro avaliou a eficácia de nebulizador, contendo inóculo positivo à *M. hyopneumoniae*, para exposição de leitões de reposição em um programa de aclimação. O experimento foi realizado em duas fases. Na fase 1, um total de 34 e 107 leitões foram selecionadas de duas granjas (A e B), e expostas ao inóculo através do uso de um nebulizador. O inóculo utilizado nas granjas A e B foi diluído nos meios PPLO e Friis, respectivamente. Na fase 2, uma subamostra de leitões da granja B foi monitorada até o parto e os leitões nascidos destas leitões foram monitorados dos 15 dias de vida até o abate. Os resultados mostraram que o uso de nebulização com inóculo positivo de *M. hyopneumoniae* foi capaz de aclimatar leitões independente do meio utilizado. Entretanto, não evitou a presença de leitões positivos ao parto e a detecção do agente em sua progênie na PCR. Nas fases de creche e terminação houve um aumento na prevalência de animais positivos. Para o controle da pneumonia enzoótica é frequente o uso de antimicrobianos (ATM), aumentando o seu consumo no sistema de produção de suínos. No intuito de reduzir o uso de ATM, o segundo estudo avaliou o uso de extrato herbal (HE) em substituição aos ATM na ração durante a fase de creche e terminação em suínos positivos ao *M. hyopneumoniae*. Um total de 324 leitões desmamados foram submetidos a três tratamentos ATM-Free (sem antimicrobiano), HE (com extrato herbal) e ATM (com antimicrobiano) e o seu desempenho avaliado na creche, terminação e no abate. No período de creche não houve diferença ($P \geq 0,05$) em peso vivo, ganho de peso diário e percentual de mortalidade/refugagem entre o tratamento com HE e com ATM. No entanto, a conversão alimentar foi pior no HE comparado ao ATM. Resultados similares em peso vivo foram observados na fase de terminação. Ao abate a presença de lesões pulmonares e a detecção do agente na PCR em todos os tratamentos confirmou a presença de doença respiratória. Apesar de não haver diferença ($P = 0.159$) no escore de lesões pulmonares entre os tratamentos, a prevalência de lesões pulmonares com grau leve foi maior no ATM e HE do que no ATM-Free. Este estudo mostrou que o extrato herbal pode ser considerado como uma alternativa de substituição aos ATM na ração sem impactos relevantes em performance, exceto em taxa de refugagem. Em rebanhos positivos à *M. hyopneumoniae* existem outros agentes respiratórios que em situação de elevada pressão de infecção do ambiente, como a mistura de origens, podem

causar quadros clínicos de doença respiratória. Neste sentido, um terceiro estudo observacional foi realizado para avaliar o impacto do fluxo de produção e das características sanitárias da origem dos leitões na contaminação do ambiente em rebanhos endêmicos para *M. hyopneumoniae*. O estudo foi realizado na fase de creche utilizando 3 fluxos de produção: origem única, duas origens e três origens. Amostras de superfície do ambiente foram coletadas para avaliar a detecção de bactérias e vírus pela PCR antes do alojamento dos leitões e durante o período de creche. Os resultados de PCR mostraram que patógenos respiratórios foram detectados em todas as origens avaliadas no estudo, com uma alta prevalência para *Glaesserella parasuis* e *Pasteurella multocida*. O fluxo de produção com mistura de três origens apresentou uma maior prevalência de *Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida* e PCV2 em comparação com as origens únicas, o que sugere uma alta pressão de infecção neste modelo de fluxo. No entanto, *M. hyopneumoniae* não foi detectado nas amostras de superfície. Estudos adicionais são necessários devido o ciclo da doença em rebanhos endêmicos. O atual estudo demonstrou que amostras de lenços de superfície podem ser usadas para monitorar a presença de diversos agentes patogênicos para suínos e que o número e as características das origens dos leitões podem ter impacto na contaminação do ambiente, o que poderia aumentar a pressão de infecção na fase de creche e favorecer a ocorrência de doenças como Doença de Glässer, Pasteurelose pulmonar e Circovirose suína. Estes estudos mostraram que métodos alternativos de controle da infecção por *M. hyopneumoniae* são possíveis na suinocultura tecnificada.

Alternatives for controlling *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs¹

Author: Ricardo Yuiti Nagae

Adviser: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

Co-advisers: Profa. Dra. Karine Ludwig Takeuti, Prof. Dr. Fernando Pandolfo Bortolozzo e Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) is the causative agent of Enzootic Pneumonia, responsible for significant economic losses to pig production worldwide. The aim of this dissertation was to generate information and strategies for *M. hyopneumoniae* control in on swine production system. Three studies were performed to accomplish this aim. The first evaluated the efficacy of a fogger containing a positive inoculum of *M. hyopneumoniae* to expose negative prepubertal gilts in an acclimation program. The trial was performed in two phases. In phase 1, a total of 34 and 107 gilts were selected from Farms A and B, respectively, and then exposed to the inoculum through a fogger at 150 days of age. The inoculum used in Farms A and B was diluted in PPLO and Friis media, respectively. In phase 2, a subsample of animals from Farm B followed up to their first farrowing and piglets born to those gilts were sampled from 15 days of age and at slaughter the lung lesions were evaluated. Results showed that the use of fogging with a lung homogenate positive for *M. hyopneumoniae* successfully acclimated negative gilts regardless of the medium type. However, it did not avoid the presence of positive gilts at farrowing and the detection of the bacterium in their progeny by PCR. The prevalence of positive animals increased at nursery and finishing phase. The use of antimicrobial (ATM) treatments is frequently required for enzootic pneumonia control, increasing ATM consumption in the swine production system. In order to reduce the use of ATM, the second study evaluated the performance of pigs from *M. hyopneumoniae* positive herds removing ATM in feed and using herbal extract replacing ATM in feed during the nursery and finishing periods. A total of 324 weaned piglets were submitted to three treatments as follows: ATM-Free (without antimicrobials), HE (with herbal extract) and ATM (with antimicrobials) and their productive performance was evaluated at nursery, finishing and at slaughter. The body weight, average daily weight gain and mortality/removals rate at the end of nursery phase on HE treatment did not differ from use of ATM. However, the feed conversion ratio was slightly worse in HE compared to ATM at the nursery phase. Similar results on productive performance in the finishing phase were observed for body weight. At slaughter the presence of macroscopic lung lesions and PCR detection in all treatments confirmed the presence of respiratory disease. Even though, lung lesions score did not differ

among treatments, the prevalence of low lungs lesions was higher at the ATM and HE than the ATM-Free. This study showed that the herbal extract can be considered as an alternative to ATM in the feed without relevant impacts on performance, except for the removals rate. In herds positive for *M. hyopneumoniae*, there are other respiratory pathogens, in a situation of high infection pressure in the environment, such as a mixture of origins, can cause clinical signs of respiratory disease. The third trial was performed to evaluate impact of pig flow and sanitary characteristics of the piglet source on the environmental contamination in endemic herds. The observational study was performed in the nursery phase: single source, double source and triple source. Environmental samples collections were performed in the rooms to evaluate the detection of bacterial and viruses by PCR on samples prior to housing of piglets and at nursery period. The results of PCR showed that respiratory pathogens were detected in all sources evaluated in this trial, with a high prevalence of the *Glaesserella parasuis* and *Pasteurella multocida*. Triple sources presented the highest prevalence of *Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida* and PCV2 compared to the single sources, suggesting a high infection pressure in this flow model. *M. hyopneumoniae* was not detected in surfaces wipes. Additional studies are needed due to the disease cycle in endemic herds. This study demonstrated that surfaces wipes could be used to monitor the presence of several pathogenic agents for pigs and that the number and characteristics of piglet sources may have an impact on environmental contamination which could increase the pressure of infection in the nursery phase and predisposes the occurrence of diseases such as Glässer's Disease, Pneumonic Pasteurellosis and Porcine Circovirus Disease. These studies showed that alternative methods of *M. hyopneumoniae* infection control are possible in technified pig farms.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figure 1.** Schematic representation of the phases 1 and 2 for assessment of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in negative replacement gilts acclimated by fogging and their piglets from lactation to slaughter 29
- Figure 2.** Prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in gilts exposed by fogging in Farms A (PPLO medium) and B (Friis medium) 32
- Figure 3.** Longitudinal assessment of the prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR from exposure to farrowing in gilts acclimated by fogging 32
- Figure 4.** Prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in piglets born to the gilts acclimated by fogging, from 15 days of age to slaughter 33

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO II**

Table 1. Vaccination programme administered to gilts and piglets	27
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Etiologia	11
2.2	Patogenia	12
2.3	Epidemiologia	13
2.4	Sinais Clínicos e Lesões	14
2.5	Diagnóstico.....	15
2.6	Controle	16
3	CAPÍTULO II – Primeiro artigo científico	22
4	CAPÍTULO III – Segundo artigo científico.....	41
5	CAPÍTULO IV – Terceiro artigo científico	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo anualmente principalmente em consequência da demanda por alimentos e a produção de suínos tem papel importante no abastecimento de carnes. No ranking de proteínas animais consumidas no mundo a suína ocupa o 3º lugar, ficando atrás apenas do pescado e do frango (OECD/FAO, 2022). Portanto, o cenário mostra uma necessidade de ampliação da capacidade produtiva do setor suinícola.

Com a redução progressiva da disponibilidade da área de terra destinada à produção agropecuária (RABOBANK, 2017), o atendimento a esta demanda vem acompanhado de um crescimento do rebanho suíno através da implantação de grandes módulos de produção, com aumento na escala de produção e maior concentração de animais por área. E de maneira geral, grande parte das granjas de suínos tecnificadas apresentam patógenos importantes de forma endêmica (CIACCI-ZANELLA et al., 2016) capazes de afetar o desempenho do animal.

Rebanhos com infecções endêmicas a agentes infecciosos, produção em grande escala e mistura de origens são fatores que, associados, elevam a pressão de infecção e, como consequência, geram maiores desafios sanitários (ROSE & MADEC, 2002; BARCELLOS et al., 2008; JOHNSON, 2018). Por outro lado, a cadeia de produção de suínos vem sendo pressionada pelas tendências globais que envolvem a redução do uso de antimicrobianos e necessidade da melhora na eficiência econômica.

Dentre os inúmeros patógenos que afetam negativamente a sanidade dos suínos, os relacionados com doenças respiratórias merece destaque, em especial o Complexo de Doenças Respiratórias do Suíno (CDRS). Entre os agentes do CDRS, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) é um dos principais agentes primários, capaz de predispor os animais às infecções com outros patógenos respiratórios, incluindo bactérias e vírus (MAES et al., 2018), causando doenças associadas com sinais clínicos respiratórios e perdas de desempenho zootécnico (PIETERS & FANO, 2016; PIETERS & MAES, 2019).

De maneira geral, o controle de infecção pelo *M. hyopneumoniae* em rebanhos endêmicos inclui um conjunto de ações com foco principalmente na melhora das práticas de manejo, das condições ambientais de criação, do uso de vacinas e aclimatação de leitões de reposição (MAES et al., 2008; PIETERS & MAES, 2019). Porém, pela complexidade da dinâmica de infecção pelo *M. hyopneumoniae*, é comum a utilização de antimicrobianos associados à programas de vacinação e de biossegurança para a redução dos danos causados pelo agente (STIPKOVITS et al., 2003; PALLARÉS et al., 2015; GARZA-MORENO et al., 2018; STINGELIN et al., 2022). Portanto, destaca-se a importância de desenvolver alternativas

para o controle do agente em rebanhos endêmicos e a redução de uso de antimicrobianos nas diferentes fases da produção dos suínos.

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar e desenvolver alternativas para o controle da infecção pelo *M. hyopneumoniae* em diferentes fases da produção em rebanhos suínos com doença endêmica.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia

Mycoplasma é um gênero de bactérias da família Mycoplasmatacea e que pertencem à classe de Mollicutes, tendo como principais características a ausência de parede celular com tamanho e genoma pequenos (RAZIN, 1998). Com a redução do tamanho do genoma, ocorreram perdas de vias metabólicas comuns entre as bactérias como a síntese de aminoácidos e ácidos graxos, sendo assim, os Mycoplasmas necessitam obter estes nutrientes do hospedeiro ou do ambiente (RAZIN, 1998). Devido à sua característica de crescimento lento e necessidades nutricionais complexas, o *Mycoplasma hyopneumoniae* é um agente muito difícil de ser isolado (MAES et al., 2018).

É um dos agentes primários do CDRS e predispõe os animais a infecções associadas outros patógenos respiratórios, incluindo bactérias e vírus (MAES et al., 2018). É causador da pneumonia enzoótica (PE) ou pneumonia micoplásmica suína, doença crônica, de alta morbidade e baixa mortalidade, caracterizada por broncopneumonia catarral e, clinicamente, por tosse seca não produtiva, sendo responsável por perdas econômicas caracterizadas pela redução no ganho de peso e piora da conversão alimentar (BARCELLOS & GUEDES, 2022).

A PE é uma doença de baixa mortalidade, porém, causa uma imunossupressão no trato respiratório e favorece co-infecções, agravando as doenças respiratórias (PIETERS & MAES, 2019). O *M. hyopneumoniae* mantém uma prolongada colonização do epitélio ciliar das vias aéreas, reduzindo a imunidade pulmonar inata e adquirida. Isso permite que as bactérias comensais do trato respiratório, como *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* e outras, proliferem nos pulmões e contribuam para a ocorrência do CDRS. Além disso, pode potencializar as doenças respiratórias virais como as causadas pelo vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, vírus Influenza A e infecção por Circovírus Suíno tipo 2. Nesse caso, os sinais clínicos são mais graves e podem incluir

desconforto respiratório grave, febre, dispneia, prostração, redução do apetite e, eventualmente, morte (PIETERS & MAES, 2019).

2.2 Patogenia

Mycoplasma hyopneumoniae adere às células epiteliais ciliadas do trato respiratório inferior, resultando na destruição dos cílios, responsáveis pela remoção de partículas indesejáveis dos pulmões. Isso provoca uma resposta inflamatória, que predispõe o pulmão a outras co-infecções e agrava o quadro respiratório (PIETERS & MAES, 2019).

A adesão do *M. hyopneumoniae* às células ciliadas é necessária para a patogênese da pneumonia enzoótica (TAJIMA et al., 1982). Inicialmente o agente adere-se à superfície da mucosa do epitélio pulmonar através das adesinas que se ligam à mucina (VRANCKX, 2011). A adesão aos cílios é iniciada por interações entre as adesinas da célula do micoplasma e receptores na membrana dos cílios das células epiteliais da traqueia, brônquio e bronquíolos (MINION et al., 1984), ocorrendo a colonização seguida pela indução de ciliostase e destruição dos cílios (DEBEY & ROSS, 1994).

Várias adesinas foram identificadas no *M. hyopneumoniae* entre elas a P97/P102 e P159 (DEUTSCHER et al., 2012; RAYMOND et al., 2013). Essas adesinas são lipoproteínas que se ligam não apenas a cílios, mas também a componentes da matriz extracelular (mucina, heparina, fibronectina e plasminogênio) que são processadas e clivadas com outras proteínas de superfície (SEYMOUR et al., 2010). Este processamento e clivagem leva a um dinamismo na topografia de superfície do *M. hyopneumoniae* que pode estar envolvido com a sua capacidade de escape do sistema imune do hospedeiro e modulação da resposta imune (BOGEMA et al., 2012; SIMIONATTO et al., 2013).

A resposta imune do hospedeiro contra o *M. hyopneumoniae* é considerada uma das principais causas das lesões pulmonares (MAES et al., 2018). Alterações histopatológicas são caracterizadas por um acúmulo de células mononucleares e infiltração de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos no lúmen e septos alveolares. Pulmões infectados apresentam exsudato broncoalveolar, alargamento dos septos alveolares e hiperplasia do tecido linfoide associado aos brônquios (BALT) (SORENSEN et al., 1997). Este acúmulo de células imunes como macrófagos e linfócitos alveolares, estimulados por *M. hyopneumoniae*, aumentam a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF)- α que são responsáveis pelas lesões pulmonares e hiperplasia de BALT (RODRIGUEZ et al., 2004; MAES et al., 2018).

Aproximadamente 3 a 5 dias após a infecção, observa-se perda evidente dos cílios na superfície brônquica (DEBEY & ROSS, 1994), sendo o mecanismo de lise celular geralmente associado à produção de peróxidos. As vias aéreas superiores são progressivamente colonizados por *M. hyopneumoniae* causando danos ao sistema mucociliar e comprometendo o sistema de limpeza respiratório, ocasionando o acúmulo de sujidades, detritos e células e, conseqüentemente, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais secundárias (CIPRIAN et al., 1994).

M. hyopneumoniae predispõe os suínos a infecções com outros patógenos secundários (MAES et al., 2018). Estudos têm demonstrado a interação do agente com *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Glaesserella parasuis*, vírus Influenza A e Circovírus Suíno tipo 2 (MORÉS et al., 2015; PALADINO et al., 2017; ARENALES et al., 2022) ocasionando lesões mais severas quando comparadas com infecções únicas (MAROIS et al., 2009).

2.3 Epidemiologia

Mycoplasma hyopneumoniae está presente em grande parte das granjas suínas em países com produção intensiva de suínos (MAES et al., 2018). Embora a susceptibilidade não esteja relacionada diretamente com a idade do animal, os sinais clínicos ocorrem geralmente nas fases de crescimento e terminação (MAES et al., 2018). Em suínos em crescimento e terminação a prevalência é alta. Mores et al. (2015) em estudo avaliando suínos de idade entre 100 a 180 dias de vida, encontraram frequência de positividade de 74% para *M. hyopneumoniae* através de exame imuno-histoquímico.

A principal fonte de infecção de *M. hyopneumoniae* é a fêmea suína, pela excreção durante a fase de lactação e contaminação dos leitões (PIETERS & FANO, 2016). Existem trabalhos na literatura que mostram a maior detecção de *M. hyopneumoniae* entre matrizes mais jovens (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000).

Os leitões são considerados livres de *M. hyopneumoniae* ao nascimento (MAES et al., 2018) tendo sua primeira exposição ainda durante o período de lactação (NATHUES et al., 2016; CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). A prevalência de leitões positivos durante o período de desmame varia de 3,6% (NATHUES et al., 2016) a 51,3% (FANO, et al., 2007). A contaminação dos leitões em rebanhos endêmicos ao *M. hyopneumoniae* ocorre durante a fase de lactação e dentre as categorias de matrizes a leitoa é uma fonte importante nesta transmissão

(CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000; PIETERS, 2014; TAKEUTI et al., 2017a, TAKEUTI et al., 2017b).

A transmissão é lenta, com uma taxa de transmissão média 1,16, ou seja, um animal infectado é capaz de infectar por contato direto aproximadamente um animal no período de creche (MEYES et al., 2004). Segundo Pieters (2009), a transmissão por contato direto entre animais é ineficiente e há disseminação lenta da doença, sendo que a colonização nos suínos permanece por longo período de tempo (entre 7 e 8 meses) em condições experimentais.

Portanto, alternativas de controle do agente através da aclimação de leitões para reduzir a excreção na fase de lactação são importantes ferramentas para redução do impacto da infecção pelo *M. hyopneumoniae* nas fases de creche e terminação, otimizando o desempenho e podendo levar à redução de uso de antimicrobianos nestas fases.

Variantes genéticas de *M. hyopneumoniae* têm sido encontradas em trabalhos prévios através do uso da técnica de MLVA (*multilocus variable number of tandem repeat analysis*) (DOS SANTOS et al., 2015; PANTOJA et al., 2016; TAKEUTI et al., 2017b; SOSA et al., 2019, ANDRADE et al., 2022). Segundo Villarreal et al. (2008), suínos inoculados com isolados de baixa virulência de *M. hyopneumoniae* não são protegidos contra uma posterior infecção com um isolado de alta virulência, podendo desenvolver sinais mais graves da doença.

2.4 Sinais Clínicos e Lesões

A infecção causada por *M. hyopneumoniae* apresenta alta morbidade, porém, baixa mortalidade (PIETERS & MAES, 2019), caracterizada por uma tosse seca não produtiva intermitente (SIBILA et al., 2009; SORENSEN et al., 1997) que pode durar meses.

Os sinais clínicos por *M. hyopneumoniae* podem apresentar-se de duas formas: a epidêmica e endêmica. A epidêmica é incomum e ocorre quando *M. hyopneumoniae* infecta rebanhos “livres”, onde se observa uma disseminação rápida da doença em todas as faixas etárias manifestando tosse, dispneia e hipertermia. Já a forma endêmica (PE) é a mais comumente encontrada no nosso meio, afeta alguns animais, tem disseminação lenta dentro do rebanho e apresenta-se com sinais de tosse seca não produtiva (PIETERS & MAES, 2019). A tosse normalmente aparece entre 7 a 14 dias após a infecção (SORENSEN et al., 1997; THACKER et al., 2004; VILLARREAL et al., 2009) atingindo o pico máximo após 4 a 5 semanas e desaparecendo gradualmente (GARCIA-MORANTE et al., 2016).

As lesões macroscópicas são encontradas nos pulmões nos lobos apicais, cardíacos e intermediário e, eventualmente, nos lobos diafragmáticos, caracterizadas por áreas de

consolidação de cor avermelhada a púrpura ou acinzentada, com consistência carnosa. (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2012; PIETERS & MAES, 2019).

As lesões microscópicas na fase inicial caracterizam-se pela presença de acumulados de neutrófilos no lúmen e ao redor das vias aéreas e nos alvéolos. À medida em que a doença progride, aos 7 a 28 dias é observado acúmulo acentuado de neutrófilos, fluidos e macrófagos nos alvéolos e proliferação de pneumócitos alveolares do tipo II. Após este período as lesões são caracterizadas por hiperplasia linfóide peribronquial progressiva, aumento do acúmulo de células mononucleares perivasculares e desenvolvimento de pneumonia alveolar (TAJIMA et al., 1982; HILLEN et al., 2014). A recuperação ocorre de 57 a 210 dias após a infecção (SORENSEN et al., 1997; PIETERS & MAES, 2019).

2.5 Diagnóstico

Os sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas não são patognomônicos da infecção por *M. hyopneumoniae*, sendo apenas sugestivos da infecção. O método padrão-ouro para confirmação da infecção por *M. hyopneumoniae* é a cultura usando meio Friis, porém, o crescimento lento, o alto custo e a baixa sensibilidade do método praticamente inviabilizam a sua utilidade (PIETERS & MAES, 2019).

A técnica mais empregada atualmente para a detecção é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pelas características de agilidade e sensibilidade. Esta ferramenta vem sendo utilizada tanto na detecção de animais positivos como para o monitoramento da dinâmica de infecção de *M. hyopneumoniae* em suínos vivos (CALSAMIGLIA et al., 1999a; FLABET et al., 2010; TAKEUTI, et al, 2017b). Dentre as suas variações, a nested-PCR e PCR Real Time são as mais utilizadas, sendo a primeira uma técnica qualitativa e de alta especificidade (CALSAMIGLIA et al., 1999b) enquanto a PCR Real Time é uma técnica quantitativa e com alta sensibilidade (MAROIS et al., 2010). As amostras para a PCR podem ser obtidas através da necropsia do animal coletando pulmões com lesão macroscópica sugestiva ou swabs bronquiais, ou de animais vivos na forma de swab nasal, swab laríngeo, cateter intratraqueal, lavagens traqueobrônquicas, entre outras (DUBOSSON et al. 2004; PIETERS et al., 2017; TAKEUTI et al., 2022; MOISO et al., 2019; SPONHEIM, et al., 2020, GARZA-MORENO, 2022). A sensibilidade dos tipos de amostras melhora à medida em que for direcionada ao trato respiratório inferior. Para animais em idades precoces (como na fase do desmame) existe dificuldade na coleta de amostras de trato respiratório inferior. Moiso et al. (2019), demonstraram que amostras de swab laríngeo têm maior sensibilidade na detecção de *M.*

hyopneumoniae por PCR quando comparado com amostras de swab nasal em leitões com 3 semanas. Posteriormente, Takeuti et al. (2022), demonstraram que amostras de secreções traqueobrônquicas coletadas com cateter intratraqueal mostram-se mais sensíveis do que swab laríngeo em suínos de crescimento e terminação. Amostras ambientais, que não envolvem a contenção do animal, têm sido avaliadas para a detecção do *M. hyopneumoniae* (STARK et al., 1998). Garza-Moreno et al. (2022), comparando amostras de superfície e de ar do ambiente de maternidade, demonstraram que amostras de superfície são mais sensíveis na detecção em rebanhos positivos para *M. hyopneumoniae*.

A sorologia é utilizada para fins de diagnóstico populacional para a detecção de anticorpos (IgG) específico de *M. hyopneumoniae* através do ensaio imunoenzimático ELISA (SORENSEN, et al., 1997; PIETERS & MAES, 2019). É um teste rápido, de baixo custo e de fácil implementação que fornece informações úteis sobre a presença de anticorpos de origem materna e adquiridos (SIBILA et al., 2009). No entanto, pela baixa especificidade do teste, são encontrados resultados falso-positivos em populações negativas. A hipótese mais aceita é a de que sejam infecções por outros Micoplasmas não patogênicos (PIETERS & MAES, 2019). Os kits comerciais de ELISA não são capazes de diferenciar anticorpos maternos, vacinais ou de exposição natural (SORENSEN et al., 1997; SIBILA et al., 2009). A soroconversão geralmente ocorre após 3 a 8 semanas (SORENSEN et al., 1997). A sorologia vem sendo utilizada como teste de monitoria de rebanhos negativos e a contraprova com testes de PCR.

2.6 Controle

A criação de suínos em sistemas livres de *M. hyopneumoniae* é uma forma efetiva de controle do agente, porém, o sucesso de sua implantação e manutenção depende de características dos rebanhos vizinhos e de um controle rigoroso de biossegurança que se reflete em altos custos de investimentos (MAES et al., 2018; GARZA-MORENO et al., 2018). Em rebanhos negativos para *M. hyopneumoniae*, o uso de técnicas avançadas de biossegurança e monitorias são cada vez mais comuns entre empresas genéticas e granjas de alta sanidade em países como os Estados Unidos (GARZA-MORENO et al., 2018). No Brasil, algumas empresas genéticas atuam com rebanhos negativos para suprir a demanda de leitoas negativas para a reposição de plantel.

Diferentes protocolos para a erradicação do *M. hyopneumoniae* têm sido descritos, entre eles: depopulação total com repovoamento com leitoas negativas, depopulação parcial com fechamento do rebanho associado a medicação, fechamento do rebanho com medicação e

imunização do rebanho (MAES et al., 2008; HOLST et al., 2015, SILVA et al., 2019). A depopulação total com repovoamento é reconhecido como o método mais bem-sucedido para erradicar a doença e uma das vantagens está na possibilidade de erradicar outros agentes presentes no rebanho, no entanto, tem a desvantagem da interrupção na produção durante a realização do protocolo, período este em que não ocorre a entrada de recursos financeiros (HOLST et al., 2015). A depopulação parcial, conhecido como método Suíço de depopulação, consiste na remoção de animais com idade menor do que 10 meses de idade, interrupção de partos por duas semanas e medicação do rebanho remanescente com antimicrobianos efetivos contra *M. hyopneumoniae*. No entanto, da mesma forma que no método anterior, há interrupção na produção por determinado período e risco de reinfecção na ordem de 2,6 a 10% ao ano (THACKER & MINION, 2012). O método de fechamento do rebanho com medicação e imunização do rebanho é uma adaptação do método Suíço, porém, não há a remoção de animais e interrupção de partos, minimizando perdas de produção. Consiste na exposição de todas as matrizes e leitoas ao *M. hyopneumoniae*, fechamento do rebanho por pelo menos 8 meses, vacinação de todo o rebanho e medicação do rebanho inclusive leitões com antimicrobianos com atividade contra *M. hyopneumoniae*, antes da introdução de leitoas negativas (HOLST et al., 2015; SILVA et al., 2019). A erradicação é uma ferramenta de controle efetivo, mas como comentado anteriormente, a manutenção depende de um controle rigoroso de biosseguridade (MAES et al., 2018; GARZA-MORENO et al., 2018).

De maneira geral *M. hyopneumoniae* está presente em grande parte das granjas produtoras de suínos no mundo e seu controle é necessário para reduzir o impacto das perdas econômicas causadas pelo agente (DOS SANTOS, et al., 2012; PIETERS & MAES, 2019). Medidas preventivas como práticas adequadas de manejo, ambiente, medicação estratégica e vacinação diminuem o nível de infecção no rebanho, melhorando as condições de saúde dos animais, porém, não garantem a eliminação do agente (MAES et al., 2008).

Para o controle da infecção por *M. hyopneumoniae* devem ser adotados manejos que reduzam a pressão de infecção e a transmissão do agente: aclimatação adequada de leitoas de reposição, estabilização da imunidade do rebanho, programa robusto de vacinação, alojamento com densidade adequada, uso de fluxo único sem mistura de origens, boas condições de ambiência com adequada qualidade de ar e conforto térmico (BARCELLOS et al., 2008; JOHNSON, 2018; MAES et al., 2018). Como citado anteriormente, rebanhos endêmicos, produção em grande escala e mistura de origens são fatores que, associados, elevam a pressão de infecção, aumentando as chances de surtos sanitários e perda de desempenho zootécnico (ROSE & MADEC, 2002; BARCELLOS et al., 2008; JOHNSON, 2018).

A redução da excreção de *M. hyopneumoniae* no rebanho é um dos pontos importantes no seu controle. A leitoa exerce papel fundamental nesta excreção e consequente contaminação dos leitões (PIETERS & FANO, 2016; TAKEUTI et al., 2017b; GARZA-MORENO et al., 2018). Segundo Pieters & Fano (2016), a vacinação não impede a infecção ou a disseminação de *M. hyopneumoniae* no rebanho, sendo necessária a aclimação das leitoas em idades precoces com o objetivo de não apresentarem a excreção do agente no momento do parto. A exposição de *M. hyopneumoniae* durante a aclimação de leitoas deve ocorrer no momento da entrada da leitoa nos rebanhos (PIETERS & FANO, 2016; TAKEUTI et al., 2017) e pode ser realizada através de métodos de exposição natural ou controlada (GARZA-MORENO et al., 2018). A exposição natural é realizada pelo contato direto com animais positivos (BRANDALISE, et al., 2019; TAKEUTI, et al., 2023) e a sua eficiência depende da presença destes animais devido à baixa taxa de transmissão do agente (MEYS et al., 2004; ROOS et al., 2016). A exposição controlada tem sido realizada através da administração intratraqueal de *M. hyopneumoniae* ou pelo uso de aerossóis (ROBBINS et al., 2019; SPONHEIM et al., 2020). O método de aerossol é realizado com uso de inóculo diluído em caldo Friis e tem mostrado eficiência em grandes populações de leitoas (PIETERS & FANO, 2016; NICKEL et al., 2018; GOURGUES et al., 2020). Independentemente do método a exposição das leitoas deve ocorrer com animais ou inóculo provenientes do próprio rebanho, como citado por Villarreal et al. (2008), isolados de diferentes graus de patogenicidade (com diferentes estruturas antigênicas) podem não proteger contra um posterior desafio com uma amostra heteróloga.

Estudos mostram a detecção de diferentes variantes genéticas de *M. hyopneumoniae* nos rebanhos endêmicos (DOS SANTOS et al., 2015; PANTOJA et al., 2016; TAKEUTI et al., 2017b; SOSA et al., 2019, ANDRADE et al., 2022). A reposição de planteis endêmicos para *M. hyopneumoniae* com uso de leitoas negativas é uma estratégia eficaz para reduzir a entrada destas novas variantes do agente no plantel e, em consequência, reduzir os casos clínicos de doenças respiratórias nas fases de creche, recria e terminação (PIETERS & FANO, 2016). Porém, para a aclimação desta categoria de leitoas deve ser realizada de maneira segura para evitar a ocorrência de sinais clínicos na granja e ocasionar uma instabilidade sanitária do rebanho.

A vacinação contra *M. hyopneumoniae* é a estratégia de controle mais comumente utilizada nos sistemas de produção de suínos em todo o mundo (MAES et al., 2018). Vacinas comerciais inativadas estão disponíveis para uso são em sua maioria bacterinas que reduzem o impacto das lesões da PE, contudo, como citado por Pieters & Fano (2016), não previnem a colonização pelo *M. hyopneumoniae* e têm um efeito limitado na transmissão (THACKER et

al., 1998; MAES et al., 2021). Os efeitos das vacinas comerciais são variáveis entre os rebanhos e têm sido atribuídos principalmente a fatores como condições inadequadas de armazenamento ou de aplicação das vacinas, presença da doença no momento da vacinação, interferência da imunidade passiva (colostral) na resposta vacinal e diferenças antigênicas entre cepas de campo e vacinais (MAES et al., 2008). A imunidade mediada por células e a imunidade humoral da mucosa são consideradas importantes para a proteção, embora os animais infectados não sejam capazes de eliminar rapidamente *M. hyopneumoniae* das vias respiratórias. Portanto, as novas vacinas devem visar este modelo de resposta imunitária (MAES et al., 2021). Estudos conduzidos por Dobbs et al. (2009), demonstraram que respostas imunes mediadas por células T são consideradas importantes para a proteção contra micoplasmas, indicando que as respostas das células T helper 1, T17 e CD8+ são responsáveis pela proteção contra a doença causada pelo Mycoplasma, enquanto que as respostas células T helper 2 são menos eficientes no controle da infecção contribuindo para a imunopatologia. Em experimento conduzido por Thacker et al. (2000a), suínos vacinados apresentaram redução das lesões pulmonares e um nível mais elevado de linfócitos sanguíneos secretores de IFN- γ em comparação com os não vacinados.

Estratégias de uso de antimicrobianos (ATM) associadas com a otimização de manejos, biossegurança e programas de vacinação têm sido utilizadas para o controle de *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2020), no entanto, não mostram-se efetivas sem a tomada de medidas de prevenção citadas. Os antimicrobianos mais utilizados para o controle de *M. hyopneumoniae* são os macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas, anfenicóis, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (VICCA et al., 2005; MAES et al., 2008; STINGELIN et al., 2022). Como o agente não possui parede celular, ATM beta-lactâmicos (como as penicilinas e cefalosporinas) não têm ação contra *M. hyopneumoniae* (MAES et al., 2008), mas mostram bom espectro em relação aos principais agentes bacterianos secundários. Estudos demonstram que o uso de ATM associado a programas de vacinação reduzem os danos causados por *M. hyopneumoniae* com o aumento do ganho médio de peso diário e redução da gravidade das lesões pulmonares (STIPKOVITS et al., 2003; PALLARÉS et al., 2015; STINGELIN et al., 2022). Segundo Cromwell (2002), o uso de antimicrobianos durante a fase de crescimento beneficia a taxa e a eficiência do ganho de peso corporal, reduz a mortalidade e morbidade, reduz a doença subclínica e melhora a saúde dos suínos. Entretanto, esse uso de antimicrobianos de forma prolongada e de forma preventiva vem sendo amplamente questionado por questões relacionadas à indução da resistência bacteriana aos princípios ativos utilizados. Portanto, o uso de antimicrobianos deve ser realizado de maneira estratégica e prudente. Segundo Barcellos et

al. (2009), o conceito do uso prudente de antimicrobianos envolve recomendações e atitudes para normatizar o uso racional e adequado, visando a evitar o aparecimento de resistência bacteriana e maximizar a eficácia dos produtos usados.

Extratos herbais (HE) têm sido utilizados como alternativas aos antimicrobianos na produção animal (KIM et al., 2008; YANG et al., 2015; BASCHIERI et al., 2017), melhorando o status imune e a performance dos suínos (CHO et al., 2006; LI et al., 2012; TAN et al., 2015; ZOU et al., 2016). As atividades antimicrobianas dos HE têm sido comprovadas através de resultados de experimentos que demonstraram de concentrações inibitórias mínimas (MIC) com efeitos semelhantes à maioria dos antibióticos comerciais (DUARTE, 2006; ROSATO et al., 2007; GONELIMALI, et al. 2018). Dentre os HE o carvacrol tem sido reportado exercendo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidante e melhorando a saúde intestinal (JAMROZ et al., 2006; NOSTRO & PAPALIA, 2012; COSTA et al., 2013; SUNTRES et al., 2015; SILVA et al., 2018). A sua atividade antimicrobiana ocorre devido aos danos causados à integridade da membrana citoplasmática bacteriana (LAMBERT et al., 2001; OMONIJO et al., 2018). O carvacrol é um monoterpene de estrutura fenólica, possuindo propriedades biológicas que atuam como barreira a processos mediados por radicais livres, como irritação e inflamação, devido à sua ação antioxidante e tem se destacado pela sua ampla gama de efeitos terapêuticos, relatados inclusive em relação a distúrbios respiratórios em humanos e roedores (CARVALHO et al., 2020). Estudos realizados em roedores demonstraram a redução do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias que possuem papel importante na modulação das lesões pulmonares (FENG & JIA, 2014; CARVALHO et al., 2019).

Outro fator com papel importante para as infecções respiratórias de suínos são as falhas nas condições de ambiente e de má higiene que geram alta pressão de infecção no ambiente, dessa forma aumentando a presença e gravidade das doenças respiratórias (BARCELLOS et al., 2008). Granjas de ciclo completo apresentam menos problemas respiratórios do que sistemas de múltiplos sítios, principalmente quando ocorre misturas de animais de diferentes origens em creches e/ou terminações (BARCELLOS et al., 2008). Portanto, o fluxo de produção com a mistura de diferentes origens no alojamento mostra-se como um fator importante no aumento da pressão de infecção no lote de suínos e pode levar ao aumento da diversidade de agentes bacterianos e virais presentes no ambiente infectando os animais. O status sanitário das granjas associado a stress imunitário e exposição aos patógenos podem reduzir o crescimento e a eficiência alimentar (LE FLOC'H et al., 2009). Condições sanitárias precárias aumentam o escore de pleurites e aumentam a estimulação sistema imune (PASTORELLI et al., 2012b). Os

efeitos na redução de desempenho em suínos submetidos a condições sanitárias precárias têm sido associado ao aumento de citocinas pro-inflamatórias (JOHNSON, 1997).

3 CAPÍTULO II – Primeiro artigo científico

Acclimation of replacement gilts to *Mycoplasma hyopneumoniae*: a case study of fogging with an aerosol inoculum

Artigo publicado: Animal Production Science - <https://doi.org/10.1071/AN22367>

Acclimation of replacement gilts to *Mycoplasma hyopneumoniae*: a case study of fogging with an aerosol inoculum

Ricardo Y. Nagae^{A,B}, David E.S.N. Barcellos^A, Rafael R. Ulguim^A, Taís R. Michaelsen^B, João P. Zuffo^B, Mariana S. Goslar^B, Giovanni R. Micheletto^B, Jonatas Wolf^B, Fernando P. Bortolozzo^A and Karine L. Takeuti^{*C}

^ASetor de Suínos, College of Veterinary Medicine - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - BR;

^BSeara Alimentos Ltda – Santa Catarina, Itajaí – BR;

^CCollege of Veterinary Medicine – Universidade Feevale, Campo Bom – BR;

*Corresponding author: karinelt87@yahoo.com.br

Keywords: Enzootic Pneumonia, exposure, Friis, inoculum, longitudinal study, lung homogenate, PPLO, transmission.

Summary

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of Enzootic Pneumonia, responsible for significant economic losses to pig production worldwide. One of the control strategies is the acclimation of replacement gilts prior to their entrance to the farm, which was the aim of this study. Our results showed that the use of fogging with a positive inoculum of *M. hyopneumoniae* is capable of acclimating gilts, which could be a useful tool to control Enzootic Pneumonia in gilts.

Abstract

Context: *Mycoplasma hyopneumoniae* causes Enzootic Pneumonia, predisposing pigs to infections with other respiratory pathogens. The main control measure is the reduction of piglets' contamination at lactation, which can be achieved by gilts' acclimation prior to their entrance to the farms. One of the acclimation strategies is the aerosol exposure with a positive inoculum using a fogger. However, studies on its efficacy in gilts and their litters are lacking in the literature.

Aim: This case study aimed to assess the efficacy of a fogger containing a positive inoculum of *M. hyopneumoniae* to expose negative gilts in an acclimation programme. Moreover, the infection dynamics of *M. hyopneumoniae* were assessed in their piglets from lactation to slaughter.

Methods: The trial was performed in two phases. In phase 1, a total of 34 and 107 gilts were selected from Farms A and B, respectively, and then exposed to the inoculum through a fogger. In phase 2, a subsample of 74 gilts from Farm B was followed up to their first farrowing and 263 piglets born to those gilts were sampled from 15 to 170 days of age, and at slaughter the lung lesions were evaluated.

Key results: In phase 1, the prevalence of positive gilts at 28 days post exposure (dpe) was 100% and 98.1% in Farms A and B, respectively. In phase 2, 10.8% remained positive at 180 dpe and 0.8% of piglets was positive at 15 days of age (d) and 28.1% at 60d, suggesting a possible vertical transmission.

Conclusion: The use of fogging with a lung homogenate positive for *M. hyopneumoniae* successfully acclimated negative gilts. However, it did not avoid the presence of positive gilts at farrowing and the detection of the bacterium in their progeny by PCR.

Implications: The exposure of gilts at 150 days of age was successfully achieved by fogging, however, it is suggested to consider the age of replacement gilts at the time of exposure in order to reduce the odds of detecting positive gilts at first farrowing.

Introduction

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) is one of the primary agents of the Porcine Respiratory Disease Complex and predisposes pigs to concurrent infections with other respiratory pathogens including bacteria and viruses (Maes *et al.* 2018). The agent causes the Enzootic Pneumonia (EP), a chronic disease which occurs worldwide (Maes *et al.* 2018). EP mainly affects growing and finishing pigs and is characterised by bronchopneumonia, a dry non-productive cough, reduced weight gain and increased feed conversion ratio (Pieters and Maes 2019).

The main route of transmission is contact between infected and susceptible pigs (Maes *et al.* 2018). Piglets are negative for *M. hyopneumoniae* at birth (Sibila *et al.* 2007), but a first exposure may occur during the lactation period when piglets are in contact with shedding dams (Calsamiglia and Pijoan 2000; Nathues *et al.* 2016), especially primiparous dams (Calsamiglia and Pijoan 2000; Pieters *et al.* 2014; Takeuti *et al.* 2017a). Once infected, piglets transmit *M. hyopneumoniae* to other pigs in the subsequent stages of production, which may lead to increased lung lesions at slaughter (Fano *et al.* 2007). The low transmission rate of *M. hyopneumoniae* (Meyns *et al.* 2004), the long period of shedding and the presence of susceptible

pigs in endemic herds may contribute to the maintenance of the bacteria in the herds (Pieters *et al.* 2009).

Different genetic variants of *M. hyopneumoniae* have been found in endemic pig herds (Dos Santos *et al.* 2015; Pantoja *et al.* 2016; Takeuti *et al.* 2017b; Sosa *et al.* 2019). Pigs inoculated with low virulence isolates of *M. hyopneumoniae* are not protected against subsequent infection with high virulence strains, which may determine more severe clinical signs and lung lesions (Villarreal *et al.* 2009). Therefore, it is important to avoid the entrance of new variants of *M. hyopneumoniae* into pig herds in order to stabilise herd immunity, which may be achieved by the introduction of negative replacement gilts (Pieters and Fano 2016). Regardless of the source of gilts, acclimation to *M. hyopneumoniae* in positive herds should be performed to reduce the probability of shedding at farrowing and/or lactation phases and the emergence of negative subpopulations (Takeuti *et al.* 2017a).

Exposure to *M. hyopneumoniae* during acclimation can be carried out through natural or controlled exposure methods (Garza-Moreno *et al.* 2018). In natural exposure, the efficiency of transmission depends on the presence of shedding animals, which is difficult due to the low transmission rate (Meyns *et al.* 2004; Roos *et al.* 2016). Controlled exposure has been performed by the administration of intratracheal *M. hyopneumoniae* positive homogenate lung tissue (Robbins *et al.* 2019; Sponheim *et al.* 2020) or by the aerosol route. The aerosol method has shown a satisfactory efficacy on *M. hyopneumoniae* exposure in large populations of gilts (Nickel *et al.* 2018; Gourgues *et al.* 2020). However, studies on the efficacy of exposure to *M. hyopneumoniae* by the aerosol route (fogger) in prepubertal gilts on reducing the prevalence of shedding gilts at farrowing and its impact on their litters up to slaughter are lacking in the literature.

Thus, the present case study aimed to evaluate the efficacy of a fogger containing an inoculum prepared with a positive *M. hyopneumoniae* lung homogenate using two different media to expose negative prepubertal gilts during an acclimation programme. Moreover, the infection dynamics were assessed from lactation to slaughter in their litters in a longitudinal study.

Materials and Methods

Ethical conduct

All management and procedures used in this experiment were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), under protocol number 38906.

Animals, housing and management

The case study was conducted in a swine production system located in Santa Catarina, Brazil. The trial was carried out following a multi-site production flow: two sow farms (1,110 sows/farm), a nursery farm (2,800 pigs) and a finishing farm (600 pigs).

A total of 480 replacement gilts were obtained from a negative *M. hyopneumoniae* multiplier pig farm, with an average of 150 days of age. They were distributed into two sow farms (240 gilts in Farm A and 240 gilts in Farm B) and were exposed to a *M. hyopneumoniae* positive inoculum by aerosol (explained in the study design). The facilities were newly built and the first animals housed were the gilts of this study on both farms. All barns had the temperature and air quality controlled by a negative pressure system equipped with exhaust fans, inlets, evaporative plate cooling systems, an isothermal roof and double curtains. The pens had partially slatted floors and an automated system for feeding was used. During the puberty induction period, groups of 22 gilts were housed in each pen and then moved to individual crates after the first oestrus. After insemination, they were moved to a gestation barn in collective pens lodging 20 gilts/pen. In the farrowing rooms, the gilts were housed in crates until weaning (21 days of lactation).

Piglets weaned from Farm B were transferred to a nursery farm and followed until slaughter. Only piglets from gilts exposed by fogging in Farm B were housed in the subsequent facilities. These piglets were randomly selected at birth (five piglets per gilt), tattooed and ear tagged. No cross-fostering was allowed in the litters of the study and all selected piglets remained with their dams up to weaning. They were housed in the nursery with a capacity for 2,800 piglets in pens with 50 piglets/pen from weaning to 70 days of age. The pens were composed of fully slatted plastic floors, an automatic feeder and four nipple drinkers/pen. The temperature and air quality were controlled by a negative pressure system equipped with exhaust fans, inlets, wood furnace, evaporative plate cooling system and double curtain lining. The same piglets were moved to a finishing farm at 70 days of age and housed in pens with 22 pigs/pen up to slaughter

(170 days of age). This facility had a compact floor, manual feeders, two nipple drinkers/pen and a double curtain lining to control the temperature and air quality.

Piglets were medicated with 15 mg/kg of amoxicillin (Farmaxilin[®] 50, Farmabase) by the oral route (water) at 30 days of age and at 53 days of age (nursery phase), both for seven days. Additional antimicrobial treatment in feed was also administered during the growing/finishing phase when respiratory clinical signs were observed: tiamulin 10.0 mg/kg (Denagard[™] 80%, Elanco[®]) and florfenicol 25 mg/kg (Amphenor[®] 50, Sanphar[®]). In all phases, sick animals (replacement gilts and piglets) were individually medicated by the intramuscular route according to the disease. The injectable antimicrobials administered were: amoxicillin 15 mg/kg (Vetrimoxin Advande, Ceva; Farmaxilin[®] 50, Farmabase) or ceftiofur 5 mg/kg (CEF-50, União Química Farmacêutica Nacional). The piglets and gilts were also submitted to a vaccination programme according to the manufacturer's guidelines (Table 1).

Table 1. Vaccination programme administrated to gilts and piglets.

Vaccine	Commercial name (Manufacturer)	Protocol
<i>Gilts</i>		
Reproductive	Porcilis [®] ERY+PARVO (MSD)	Two doses (6 and 2 weeks before mating)
Circovirus type 2	Ingelvac Circoflex [®] (Boehringer Ingelheim)	One dose at 170 days of age
Colibacillosis	Porcilis [®] COLI (MSD)	Two doses (6 and 2 weeks prior to farrowing)
Atrophic Rhinitis	Porcilis [®] AR-T (MSD)	Two doses (6 and 2 weeks prior to farrowing)
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Hyogen [®] (CEVA)	One dose (6 weeks prior to farrowing)
<i>Piglets</i>		
Circovirus type 2	Ingelvac Circoflex [®] (Boehringer Ingelheim)	One dose at weaning
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Hyogen [®] (CEVA)	One dose at weaning
Porcine proliferative enteritis	Porcilis [®] Ileitis (MSD)	One dose at weaning

Study design

The study was performed in two phases, as presented in Fig. 1. In phase 1, the fogger (Nebulizador Atomizador Eléctrico a Frio, GUARANY, Brazil) used for *M. hyopneumoniae* exposure was evaluated using two diluent media, PPLO (Pleuropneumonia-like Organisms) and Friis, in Farms A and B, respectively, to evaluate the prevalence of positive gilts up to 42 days post exposure (dpe). In phase 2, the *M. hyopneumoniae* prevalence on Farm B (Friis medium) was evaluated from exposure to farrowing in gilts and from weaning to slaughter in their litters in a longitudinal study.

Phase 1 – Diluent medium for acclimation of replacement gilts using a fogger

From the total number of replacement gilts obtained from the multiplier pig farm, a total of 34 and 107 gilts were randomly selected to be sampled in Farms A and B, respectively. Blood and tracheobronchial secretion (TBS) samples were collected (for serology and PCR, respectively) from gilts prior to fogging exposure. Additional blood samples were collected at 42 dpe for serology. The fogger exposure was performed in a single moment, immediately after the entrance of the gilts to the farms at 150 days of age. The inoculum used on Farms A and B was diluted in PPLO and Friis media, respectively. TBS samplings were performed at 0, 14, 28 and 42 dpe.

Phase 2 – Acclimation of gilts using a fogger and prevalence detection of their litters

A subsample of 74 gilts from the 107 used in phase 1 (Farm B) were followed until farrowing. In this case, additional TBS samples (beyond 42 dpe) were collected at 56, 90, 120, 150 and 180 dpe. The insemination procedure occurred around 56 dpe and farrowing at 180 dpe. Five piglets per litter from 70 gilts ($n = 350$) were tattooed and ear tagged at birth. However, due to death and removals, a total of 263 piglets remained in the study up to slaughter. No cross-fostering was allowed in the litters and all selected piglets remained with their dams until weaning. TBS were collected from piglets at 15, 60, 100 and 140 days of age. Additionally, bronchial swabs (BS) were collected from lungs of slaughtered pigs at 170 days of age for *M. hyopneumoniae* detection by PCR.

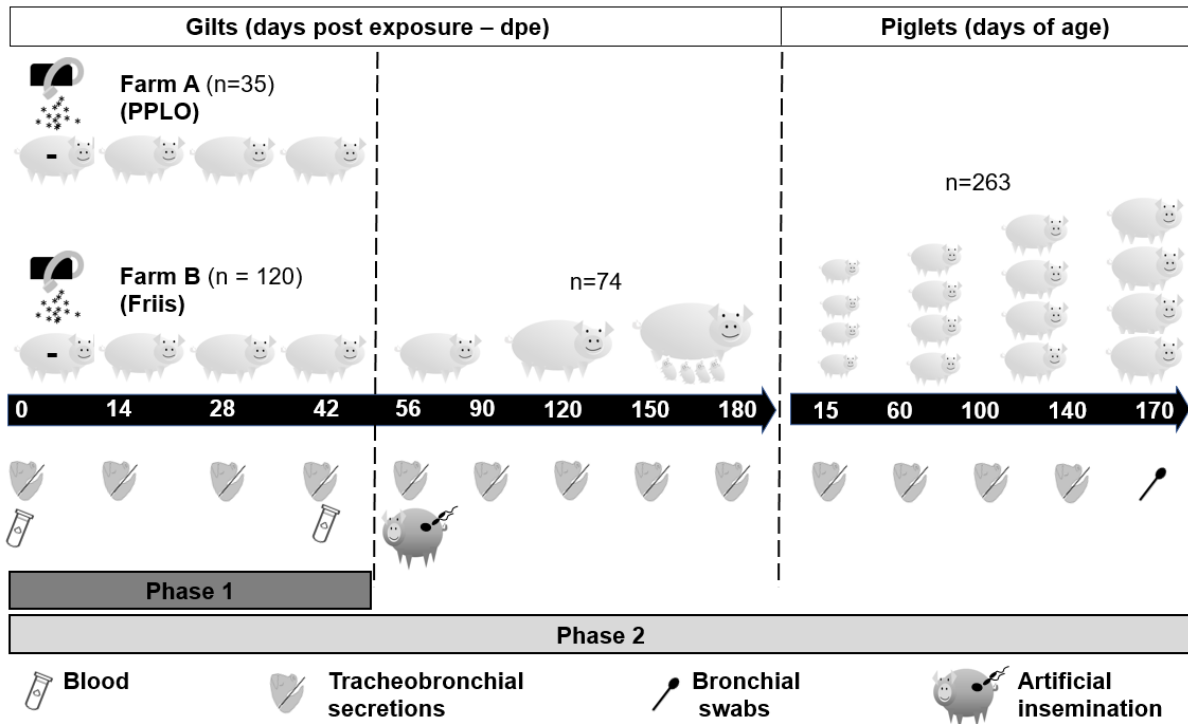


Fig. 1. Schematic representation of the phases 1 and 2 for assessment of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in negative replacement gilts acclimated by fogging and their piglets from lactation to slaughter.

Preparation of the inoculum with M. hyopneumoniae and exposure using fogging

Preparation of the positive *M. hyopneumoniae* lung homogenate was performed by collecting lungs from donor pigs as described by Robbins *et al.* (2019). A commercial finishing farm, belonging to the same integrator company, was selected for lung collection based on the presence of *M. hyopneumoniae* infection, indicated by respiratory clinical signs, diagnostic history and the presence of lung lesions at slaughter. A total of 20 pigs with approximately 140 days of age presenting respiratory clinical signs suggestive of EP were selected and medicated with ceftiofur (5 mg/kg; CEF-50, União Química Farmacêutica Nacional, Brazil). At this moment, TBS were collected and submitted to *M. hyopneumoniae* detection by PCR. Pigs with cycle threshold (Ct) values lower than 30 were selected for euthanasia three days post medication with ceftiofur. Out of the 20 animals sampled, two pigs with $Ct \leq 26$ were selected as donors for the preparation of lung homogenate, as suggested by Robbins *et al.* (2019).

Lung selection criteria were determined according to macroscopic lesions (apical and cardiac lung lobes) and PCR results to obtain a concentration of 1×10^5 CCU/mL (colony changing units/mL) or higher of *M. hyopneumoniae* (Robbins *et al.* 2019). The lungs were tested for *M.*

hyopneumoniae (Dubosson *et al.* 2004), influenza (Zhang and Harmon *et al.* 2014), Porcine Circovirus 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) (Li *et al.* 2018) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Tobias *et al.* 2012) by PCR to ensure an inoculum free of other pathogens. After the lungs' selection, they were frozen at -80°C and thawed after 24 hours at 4°C . The inoculum was prepared as described by Nickel *et al.* (2018). Briefly, a lung lobe with consolidation was selected, mixed in Friis medium using a proportion of 60% of lung in 40% of Friis in a blender and stored in 50 mL tubes at -80°C . At the sow farm, the inoculum containing the homogenised lung was diluted (1:50) in each medium (PPLO or Friis) and filtered to avoid fogger clogging. The filtration procedure was performed with a mesh plastic sieve (PLASVALE, Brazil) prior the inclusion of the homogenised lung into the fogger. A total of 16 mL of the inoculum solution per gilt was used for fogging. Curtains were closed prior to nebulisation, which was performed in a single day by a trained technician standing in the hall holding the fogger above the pens and facing toward the animals. The fogger equipment was regulated using a maximum rotation button and a medium output rate to produce about 130 mL/min, with a particle size about 30 μm , at 220 volts over a total of 30 minutes. During the fogging procedure, personal involved in the practice used protective equipment including a respirator (3M 8822 PFF-2) and protective eye goggles (3M Ox Transparent). Additionally, all gilts received amoxicillin 15 mg/kg (Farmaxilin® 50, Farmabase, Brazil) by the oral route (water) from zero to seven dpe, which was repeated 20 days later.

Sample collection

Blood sampling was performed prior to exposure and at 42 dpe, as described by Dewey and Straw (2006). TBS collection was performed as described by Takeuti *et al.* (2022) after restraining the animal and using a mouth gag to enable catheter introduction (Magaplus S®, Zaragoza, Spain) into the respiratory tract. All samples were stored at -80°C until processing. At slaughter, 263 lungs of the gilts' progeny were evaluated by lung lesion scoring (LLS) and sampled using bronchial swabs (BS). LLS was evaluated as described by Madec and Kobisch (1982). The total affected lung area was evaluated as described by Christensen *et al.* (1999). BS collection was performed as described by Pieters *et al.* (2009), obtained by rotating rayon swabs (INLAB, Brazil) in the bronchia and then moving them up and down.

Laboratory analysis

TBS and BS samples were submitted to *M. hyopneumoniae* detection by PCR (Dubosson *et al.* 2004). Samples were processed for DNA extraction using the magnetic particle processor procedure of the commercial Mag Attract 96 Cador Pathogen kit (QIAGEN®, Germany) and processed on MAGMAX (Applied Biosystems™, USA) according to the manufacturer's recommendations. The amplifications were performed in a Fast Real-time PCR System 7500 (Applied Biosystems™, USA), according to the manufacturer's recommendations. Samples were tested individually and samples with a Ct value < 40 were considered positive.

Sera were tested to detect antibodies using a *M. hyopneumoniae* ELISA (IDEXX® USA) according to the manufacturer's guidelines. Samples with results of an A/P ratio ≥ 0.30 were considered negative, $0.30 \leq A/P < 0.4$ were considered suspect and an A/P ratio > 0.40 was considered positive.

Statistical analysis

Analysis of the results was performed using the R software (R Foundation for Statistical Computing). The prevalence of *M. hyopneumoniae* was estimated based on the number of positive samples (Ct < 40). Multiple comparison tests were performed with Bonferroni correction among samplings within each farm. Results were considered significant when $P \leq 0.05$. In phase 2, only farrowed gilts were considered for statistical analysis.

Results

The results of serology and PCR performed prior to exposure of gilts showed that they were negative for *M. hyopneumoniae* at the time of exposure.

Phase 1 – Diluent medium for acclimation of replacement gilts using a fogger

The prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in gilts by fogging is presented in Fig. 2. The results showed that 35.3% and 62.6% of the gilts were positive at 14 dpe on Farms A (PPLO medium) and B (Friis medium), respectively. The prevalence increased over time ($P < 0.05$), reaching the highest values at 28 dpe in both media. The exposure was confirmed by serology at 42 dpe, when 100% of the gilts were positive.

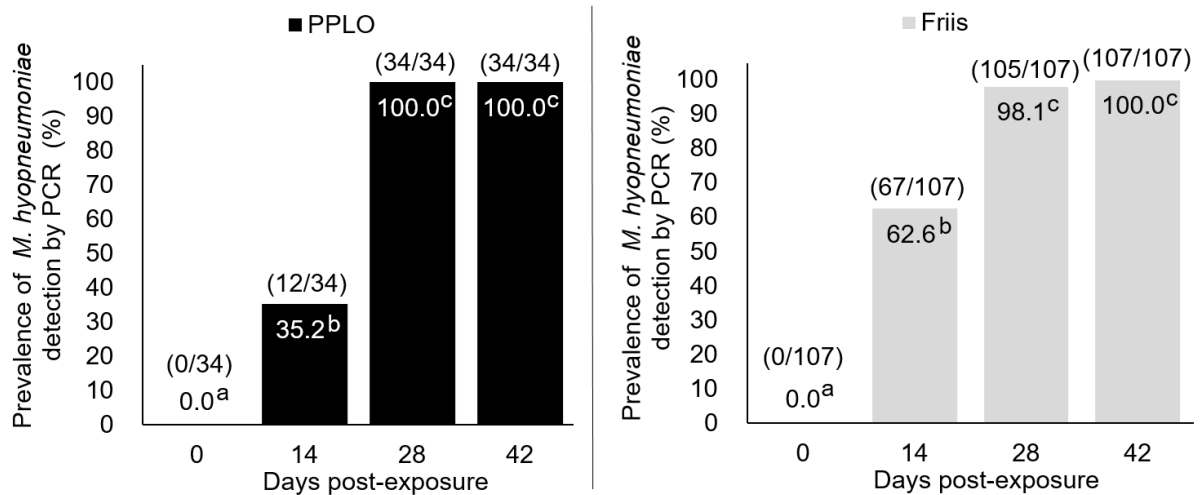


Fig. 2. Prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR in gilts exposed by fogging in Farms A (PPLO medium) and B (Friis medium). There was a significant difference over time within each farm ($P < 0.05$).

Phase 2 – Acclimation of gilts using a fogger and prevalence detection of their litters

The prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR (Fig. 3) showed a high percentage of gilts positive up to 90 dpe. However, there was a significant decrease ($P < 0.05$) from 90 dpe to 120 dpe with 10.8% of gilts positive at 180 dpe (around farrowing).

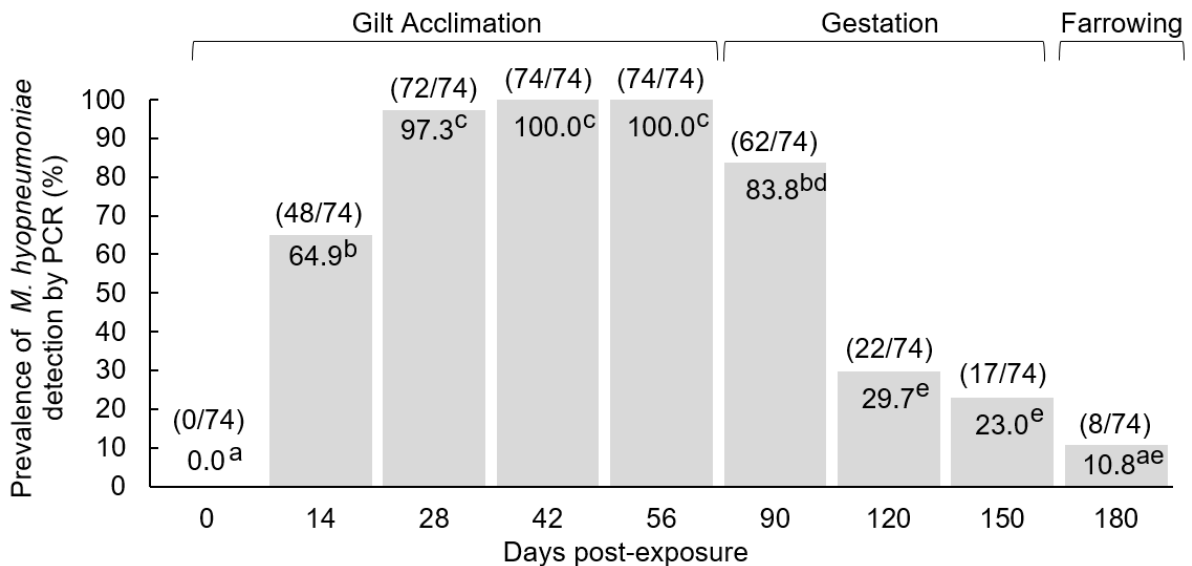


Fig. 3. Longitudinal assessment of the prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR from exposure to farrowing in gilts acclimated by fogging. There was a significant difference among sampling events over time ($P < 0.05$).

The prevalence of positive piglets born from gilts acclimated with the fogger is described in Fig. 4. A small proportion of piglets were positive at 15 days of age, but a significant increase was detected over time ($P < 0.05$). The highest prevalence was observed at 100 and 140 days of age, when 87.1% and 92.8% of piglets were detected positive by PCR, respectively.

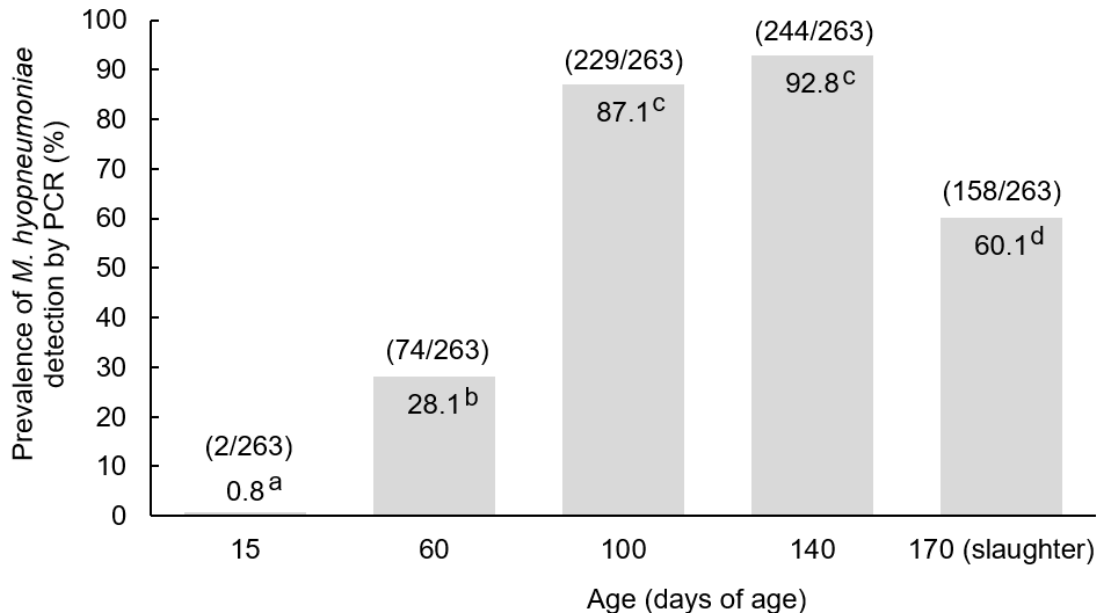


Fig. 4. Prevalence of *M. hyopneumoniae* detection by PCR (TBS: 15–140 days of age; BS: 170 days of age) in piglets born to the gilts acclimated by fogging, from 15 days of age to slaughter. There was significant difference over time ($P < 0.05$).

A total of 62.4% of the lungs presented macroscopic lesions suggestive of pneumonia. The LLS average was 1.87 and the total of affected lung area was 6.68%.

Discussion

This case study showed the efficacy of fogger exposure using a positive *M. hyopneumoniae* inoculum (using two different dilution media) for the acclimation of negative gilts up to the farrowing moment. Additionally, the infection dynamics of the litters born to the acclimated gilts was assessed from lactation to slaughter.

The gilts of our study were not vaccinated against *M. hyopneumoniae* during the acclimation programme to make interpretation of the serological results possible. This was a condition of our study, even though the benefits of *M. hyopneumoniae* vaccination during the acclimation period are known, including increasing immunity and decreasing the proportion of positive gilts

14 weeks post infection (Garza-Moreno *et al.* 2019). The serological results showed that 100% of gilts exposed to the *M. hyopneumoniae* positive inoculum were positive at 42 dpe.

The prevalence of 100% positive gilts by PCR on Farms A and B at 42 dpe, demonstrated the effectiveness of the fogger and both media (PPLO and Friis) to expose gilts to *M. hyopneumoniae*. However, PPLO may be more convenient to use in the field since it is easier to prepare. One limitation of our study is that the gilts exposed with the PPLO dilution medium were not followed up to the first farrowing, limiting the information regarding the infection dynamics of gilts at farrowing and their progeny up to slaughter. Other studies using Friis medium and a fogger (Dyna-Fog® Hurricane™ Fogger) acclimated 100% of negative gilts up to 56 dpe (Nickel *et al.* 2018) and 66.7–100% up to 28 dpe (Gourgues *et al.* 2020). Additionally, the exposure of the incoming gilts using an efficient method such as fogging, could reduce the prevalence of negative subpopulations within the herd, as described by Takeuti *et al.* (2017a). Our results suggest the efficacy of fogging as an alternative method for acclimation compared to the use of direct contact with positive older gilts or sows from the herd. As demonstrated by Roos *et al.* (2016), using direct contact, six positive seeders were needed to acclimate four negative gilts, resulting in only 38% gilts detected positive by PCR at 28 dpe. Even though fogging exposure has been effective, it should be emphasised that biosecurity risks by environmental contamination could be present due to use of an inoculum obtained from a lung homogenate (Gourgues *et al.* 2020). Consequently, in order to avoid the risk of infection of animals or humans, it is necessary to perform previous laboratory diagnostics to ensure the absence of other pathogenic bacteria and/or viruses in the lung homogenate, as performed in the present study.

It is known that different genetic variants may be found within herds (Pantoja *et al.* 2016; Takeuti *et al.* 2017b), which may present different virulence degrees with limited cross protection (Villarreal *et al.* 2009). An advantage on using a lung homogenate produced from a donor housed in the farm that will receive the gilts, would be the exposure to *M. hyopneumoniae* specific variants present in the herd. The use of a non-specific farm isolate to produce the inoculum may result in failure to protect the gilts from future exposure with other strains. The farms used in our study did not house animals previously. In this case, the inoculum was obtained from pigs of the same company, which belonged to the same flow to allow acclimation with the variants present in that specific production stratum.

Even though all gilts were detected positive by PCR at 42 dpe, 10.8% remained positive at 180 dpe (i.e. around farrowing). Similarly, Takeuti *et al.* (2017a) observed up to 15.7% of gilts positive by PCR at 330 days of age (around farrowing) when introduced into the herds at 150

days of age in *M. hyopneumoniae* positive farms. It is known that pigs experimentally infected with *M. hyopneumoniae* remain positive for up to 214 days, being able to transmit the bacterium to susceptible animals (Pieters *et al.* 2009). Due to the large period of transmission, and the results of our study, it is recommended to receive replacement gilts younger than 150 days of age to perform exposure by fogging and avoid the presence of shedding gilts at farrowing, as suggested by Pieters and Fano (2016), who suggested that acclimation should be performed no later than 50 days of age.

Due to the presence of more than 10% of positive gilts at farrowing, it is possible that a vertical transmission of *M. hyopneumoniae* had occurred to their progeny during lactation. Even though a low proportion of piglets were detected positive at 15 days of age, it is possible that we missed the detection of positive piglets due to the difficulty in collecting samples from suckling piglets at this age, which is not the ideal moment as was a limitation of our study since the authors were not capable to sample the animals at weaning. Previous studies showed a low prevalence of detection in pre-weaning piglets using laryngeal swabs (Takeuti *et al.* 2017a; Takeuti *et al.* 2017b). Despite the lower detection at 15 days of age, the detection of positive piglets increased over time, which may have resulted from the air and/or facility contamination, maternal antibodies' decrease and/or weaning stress, resulting in later contamination of the piglets in nursery and fattening units. It is also possible that we detected a higher number of positive piglets at nursery due to the ease of collecting TBS at this age.

Even though 62.4% of the lungs presented macroscopic lesions suggestive of pneumonia and 60.1% of lungs were detected positive for *M. hyopneumoniae* by PCR at slaughter, the LLS and the total affected lung area were low. Lung lesions' recovery may take 57–85 days after infection (Sorensen *et al.* 1997), which may explain the presence of less injured lung areas in our study. It is also possible that a significant proportion of lungs were already recovering from infection, as early detection of positive piglets (28.1%) was observed at the end of the nursery period. Additionally, despite the lack of extensive areas of pneumonia at slaughter, the bacterium DNA was still present and detected by bronchial swabs, due to its high sensitivity on detection by PCR, as demonstrated by Pieters *et al.* (2009) and Takeuti *et al.* (2022). Moreover, we exposed the replacement gilts with an inoculum free of other pathogens commonly associated with *M. hyopneumoniae*, such as influenza virus, PCV2 and *A. pleuropneumoniae*, which may have resulted in non-complicated infections. Furthermore, the *M. hyopneumoniae* vaccination could have affected our results. Arsenakis *et al.* (2019) demonstrated that the vaccination of sows against *M. hyopneumoniae* prior to farrowing (6 and 3 weeks prior to farrowing) significantly reduced the prevalence of positive piglets at nursery, the LLS and the

prevalence of macroscopically affected lungs of pigs born from immunised sows when compared to sows not vaccinated prior to farrowing. Additionally, Michiels *et al.* (2017) observed that piglets vaccinated against *M. hyopneumoniae* at weaning presented lower LLS and microscopic lesions in comparison to the non-vaccinated group. However, we could not test the effect of *M. hyopneumoniae* vaccination prior to farrowing on the acclimation of gilts, since we did not have a control group (not vaccinated).

Even though the use of fogging on a *M. hyopneumoniae* acclimation programme described in this study presented high efficacy in exposing negative replacement gilts, some limitations of this practice must be considered. There is a need for careful planning of the protocol, adequate selection of donors and euthanasia of donors under welfare conditions, fast laboratory processing, medium preparation and biosecurity measures during inoculum preparation and use. However, the method is fast and efficient, which resulted in 100% of gilts acclimated to *M. hyopneumoniae* after 28-42 dpe.

Conclusion

The use of fogging with lung homogenate positive for *M. hyopneumoniae* demonstrated high efficacy to acclimate negative replacement gilts regardless of the medium type (Friis or PPLO). The exposure of negative gilts at 150 days of age was successful, however, it did not avoid the presence of positive gilts at farrowing, which may have contributed to the results observed in their piglets up to slaughter. In this way, it is suggested to consider the age of replacement gilts at the time of exposure in order to reduce the proportion of gilts positive for *M. hyopneumoniae* at farrowing.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of funding

This research was supported by Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Seara Alimentos.

Acknowledgements

The authors acknowledge the assistance of swine veterinarians and producers in sample collections. This project was supported by Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Seara Alimentos.

Data Availability Statement

The data generated in this paper are available with the corresponding author.

References

- Arsenakis I, Michiels A, Schagemann G, Gomez-Duran CO, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D (2019) Effects of pre-farrowing sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. *Veterinary Record* **184**, 222.
- Calsamiglia M, Pijoan C (2000) Colonization state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record* **146**, 530-532.
- Christensen G, Sorensen V, Mousing J (1999) Diseases of the Respiratory System. In `Diseases of the Respiratory System (1st edn)`. (Eds BE Straw et al) pp.913-940. (Iowa State University Press: Ames).
- Dos Santos LF, Srrevatsan S, Torremorell M, Moreira MAS, Sibila M, Pieters M (2015) Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Veterinary Microbiology* **175**, 374-381.
- Dewey CE, Straw BE (2006) Herd examination. In `Diseases of Swine (9th edn)`. (Eds BE Straw, JJ Zimmerman, S D'Alliare) pp. 3-14. (Blackwell Publishing: Ames).
- Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, Häni H, Kuhnert P (2004) Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary Microbiology* **102**, 55-65.
- Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J (2007) Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **71**,195-200.
- Garza-Moreno L, Segalés J, Pieters M, Romagosa A, Sibila M (2018) Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Microbiology* **219**, 23-29.
- Gourgues SF, Fano E, Sebarte AA, Grasa EL, Caravaca IH, Vazquez FAG, Veja VR, Garcia-Morante B (2020) Assessment of nebulization technology for gilt exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* as an acclimation strategy. *Journal of Swine Health and Production* **28**, 294-301.

- Li X, Qiao M, Sun M, Tian K (2018) A duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of porcine circovirus 2 and circovirus 3. *Virologica Sinica* **33**, 181-186.
- Madec F, Kobisch M (1982) Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. *Journées Recherche Porcine* **14**, 405-412.
- Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Pieters M, Haesebrouck F (2018) Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transboundary and Emerging Diseases* **65**, 110-124.
- Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, Kruif A (2004) Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive Veterinary Medicine* **66**, 265-275.
- Michiels A, Vranckx K, Piepers S, Sacristán RDP, Arsenakis I, Boyen F, Haesebrouck F, Maes D (2017) Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. *Veterinary Research* **48**, 1-14.
- Nathues H, Fournie G, Wieland B, Pfeiffer DU, Stärk KDC (2016) Modelling the within-herd transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in closed pig herds. *Porcine Health Management* **2**, 1-14.
- Nickel M, Toofill E, Lehman J (2018) Use of a hurricane fogger for *Mycoplasma hyopneumoniae* inoculation in nursery age gilts. In: 'Proceedings of 49th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians'. pp. 97-98. (San Diego: California).
- Pantoja LG, Pettit K, Dos Santos LF, Tubbs R, Pieters M (2016) *Mycoplasma hyopneumoniae* genetic variability within a swine operation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **28**, 175-179.
- Pieters M, Fano E, Pijoan C, Dee S (2009) An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology* **134**, 261-266.
- Pieters M, Fano E, Pijoan C, Dee S (2010) An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **74**, 157-160.
- Pieters M, Paine B, Prado C, Ertl J, Rendahl AK (2014) Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. *Veterinary Microbiology* **172**, 575-580.
- Pieters M, Fano E (2016) *Mycoplasma hyopneumoniae* in gilts. *Veterinary Record* **178**, 122-123.

- Pieters M, Maes D (2019) *Mycoplasma hyopneumoniae*. In 'Diseases of Swine (11th edn)'. (Ed. JJ Zimmermann, LA Karkiker, A Ramirez, KJ Schwartz, GW Stevenson, J Zhang) pp. 863-871. (Wiley-Blackwell: Ames)
- Robbins RC, Betlach AM, Mondragon-Evans MR, Pieters M (2019) Development of a herd-specific lung homogenate for exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. *Journal of Swine Health and Production* **27**, 221-227.
- Roos RL, Fano E, Homwong N, Payne B, Pieters M (2016) A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. *Veterinary Microbiology* **184**, 51-58.
- Sibila M, Nofrarias M, López-Soria S, Segalés J, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M (2007) Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling piglets. *Veterinary Microbiology* **121**, 352-356.
- Sorensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, Bille-Hansen V, Jensen NE, Pedersen MW (1997) *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assay. *Veterinary Microbiology* **54**, 23-34.
- Sosa C, Blois A, Ibanez F, Tamiozzo P (2019) Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Mendoza province. *Revista Argentina de Microbiología* **51**, 229-233.
- Sponheim A, Alvarez J, Fano E, Schmalting E, Dee S, Hanson D, Wezell T, Pieters M (2020) Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection. *Veterinary Microbiology* **241**, 108500.
- Takeuti KL, Barcellos DESN, Lara AC, Kunrath CF, Pieters M (2017a) Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Veterinary Microbiology* **203**, 215-220.
- Takeuti KL, Barcellos DESN, Andrade CP, Almeida LL, Pieters M (2017b) Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. *Veterinary Microbiology* **208**, 18-24.
- Takeuti KL, Michaelsen TR, Sabedot C, Nagae RY, Forner RAN, Mazzarollo A, Barcellos DESN, Pieters M (2022) *Mycoplasma hyopneumoniae* detection by PCR in naturally infected finishing pigs. *Journal of Microbiological Methods* **197**, 106475.
- Tobias TJ, Bouma A, Klinkerberg D, Daemen AJJM, Stegemann JA, Wagenaar JA, Duim B (2012) Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs by real-time quantitative PCR for the apx IVA gene. *The Veterinary Journal* **193**, 557-570.

Villarreal I, Maes D, Meyns T, Gebruers F, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F (2009) Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* **27**, 1875-1879.

Zhang J, Harmon KM (2014) RNA extraction from swine samples and detection of Influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. *Methods in Molecular Biology* **1161**, 277-293.

4 CAPÍTULO III – Segundo artigo científico

Performance of pigs submitted to alternative antimicrobial strategies to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection from weaning to finishing phase

Artigo em revisão para ser submetido para publicação

5 CAPÍTULO IV – Terceiro artigo científico

Impact of pig flow on environmental contamination in pig nurseries

Artigo em revisão para ser submetido para publicação

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que métodos alternativos de controle da infecção por *M. hyopneumoniae* são possíveis para uso na suinocultura tecnificada. A aclimatação de leitoas negativas com uso de nebulizador com inóculo positivo para *M. hyopneumoniae* foi eficiente na exposição das leitoas, tanto com meio tradicional (Friis), quanto meio alternativo (PPL0), podendo ser uma ferramenta útil a campo. No entanto, devido à cronicidade da infecção, é fundamental que a idade em que as leitoas são expostas seja considerada, visto que, se aclimatadas tardiamente, uma parcela de animais pode chegar ao parto ainda excretando a bactéria.

Além disso, o uso de nutraceuticos via ração à base de carvacrol, um extrato herbal, mostrou-se efetivo em reduzir os impactos de perda de desempenho com a retirada de antimicrobianos na ração nas fases de creche e terminação em planteis endêmicos para *M. hyopneumoniae*. No entanto, o percentual de refugagem nos animais suplementados com carvacrol foi superior ao daqueles que receberam antimicrobianos, o que deve ser levado em consideração quando o extrato herbal for utilizado.

Por fim foi destacada a importância das características sanitárias da origem do leitão e da mistura de origens na contaminação ambiental e no aumento da pressão de infecção, o que pode acarretar em problemas clínicos futuros no plantel.

7 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.R., DANIEL, A.G.S., ZARATE, J.B., SATO, J.P.H., SANTOS, L.F., and GUEDES, R.M.C., 2022. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in finishing pigs in Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 43:e07155.
- ARENALES, A., SANTANA C. H., ROLIM A.C.R., PEREIRA E.M.M.S., NASCIMENTO E.F., PAIXÃO T.A., SANTOS R.F. Padrões histopatológicos e diagnóstico etiológico do complexo de doenças respiratórias dos suínos no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.74, n.3, p.497-508, 2022.
- BARCELLOS, D.E.S.N., BOROWSKI, S.M., GHELLER, N.B, SANTI, M., MORES T.J. Relação entre ambiente e doenças respiratórias em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.87-94, 2008.
- BARCELLOS, D.E.S.N., MARQUES, B.M.F.P., MORES, T.J., COELHO, C.F., BOROWSKI, S.M. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, p.151-155, 2009.
- BARCELLOS, D.E.S.N. & GUEDES, R.M.C. **Doença dos Suínos**, 3ed., Goiânia, p.1058, 2022.
- BASCHIERI, A., AJVAZI, M.D., TONFACK, J.L.F., VALGIMIGLI, L., AMORATI, R. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. **Food Chemistry**, v.232, p.656-663, 2017.
- BATISTA, E.B. Óleos essenciais no desempenho de suínos em crescimento terminação. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 50p., 2018.
- BOGEMA, D., DEUTSCHER, A., WOOLLEY, L., SEYMOUR, L., RAYMOND, B., TACCHI, J., DJORDJEVIC, S.P. Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which *Mycoplasma hyopneumoniae* regulates surface topography. **MBio**, v.3, e00282-11, 2012.
- BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., BENNEMANN, P.E., BERNARDI, M.L., WOLMANN, E.B., FERREIRA, F.M., BORCHARDT NETO, G. Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. **Suinocultura em Ação**. Porto Alegre, 2005, 185p.
- BOURRY, O., FLABET, C., SIMON, G., MAROIS-CREHAN, C. Efficacy of combined vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in dually infected pigs. **Veterinary Microbiology**, v.180, n. 3-4, p.230-236, 2015.

- BRANDALISE, L., DEZEN, D., KICH, J.D., TAKEUTI, K.L., CLAVIJO, M.J., SIMAO, M.R., NAGAE, R.Y., SATO, J.P.H., PIGOZZO, R. Dinâmica da infecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em leitões de reposição negativos para o agente. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.17. (Supl 1), p.197-198, 2019.
- CANNON, R.M. & ROE, R.T. Livestock disease survey: a field manual for veterinarians. **Australian Government Publishing Service**, Canberra, v.6, n.11, p.4, 1982.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C.; BOSCH, G. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. **Swine Health and Production**, v.7, n.6, p.263-268, 1999a.
- CALSAMIGLIA, M. & PIJOAN, C. Colonization state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. **Veterinary Record**, v.146, p.530-532, 2000.
- CARVALHO, F.O., SILVA, E.R., GOMES, I.A., SANTANA, H.S.R., SANTOS, D.N., Souza, G.P.O., SILVA, D.J., MONTEIRO, J.C.M., ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C., ARAÚKO, A.A.S., Nunes, P.S. Anti-inflammatory and antioxidant activity of carvacrol in the respiratory system: A systematic review and meta-analysis. **Phytotherapy Research**, 34, n.9, p.2214-2229, 2020.
- CHENG, C., XIA, M., ZHANG, S., WANG, C., JIANG, S., PENG, J. Supplementing oregano Essential Oil in a reduced-protein diet improves growth performance and nutrient digestibility by modulating intestinal bacteria, intestinal morphology, and antioxidative capacity of growing-finishing pigs. **Animals**, v.19, n.8, p.159, 2018.
- CIACCCI ZANELLA J., MORES, N., BARCELLOS, D.E.S.N. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.443-453, 2016.
- CIPRIAN, A., CRUZ, T.A. *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agentes in pigs, and evaluations of immunogens. **Archives of Medical Research**, v.25, p.235-239, 1994.
- CLARK, L.K., AMSTRONG, C.H., SCHEIT, A.B., VAN ALTINE. W.G. The effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on growth in pigs with or without environmental constraints. **Swine Health and Production**, p.10-14, 1993.
- COOK, B.S., BEDDOW, J.G., MANSO-SILVAN, L., MALGENNON, G.A., RICOFT, N. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.195, n.15, p.158-164, 2016.
- COSTA, L.B., LUCIANO, F.B., MIYADA, V.S., GOIS, F.D. Herbal extracts and organic acids as natural feed additives in pig diets. **South African Journal of Animal Science**, v.43, n.2, p.181-193, 2013.

- CRISTANI, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M.G., MICIELI, D., VENUTI, V., BISIGNANO, G., DAJA, A., TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.55, p.6300-6308, 2007.
- CROMWELL, G.L. Why and how antibiotics are use in swine production. **Animal Biotechnology**, v.13, n.1, p.7-27, 2002.
- 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, p.5312-5318, 1994.
- DEE, S., OTAKE, S., OLIVEIRA S., DEEN, J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Research**, v.40, n.4, p.39, 2009.
- DEE, S., GUZMAN, J.E., HANSONI, D., GARBES, N., MORRISON, R., AMODIE, D., PANTOJA, L.G.A Randomized controlled trial to evaluate performance of pigs raised in antibiotic-free or conventional production systems following challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **PLoS ONE**, v.13, n.12, 15p, 2018.
- DEUTSCHER, A.T., TACCHI, J. L., MINION, F., PADULA, M. P., CROSSETT, B., BOGEMA, D. R., JENKINS, C., KUIT, T. A., WALKER, M. J., DJORDJEVIC, S. P. *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.1924-1936, 2012.
- DOBBS, N.A., ODEH, A.N., SIMECKA, J.W. The multifaceted role of T cell-mediated immunity in pathogenesis and resistance to *Mycoplasma* respiratory disease. **Current Trends in Immunology**, v.10, p.1-19, 2009.
- DOS SANTOS, L.F., SRREVATSAN, S., TORREMORELL, M., MOREIRA, M.A.S., SIBILA, M., PIETES, M. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. **Veterinary Microbiology**, v.175, p.374-381, 2015.
- DRITZ, S.S., OWEN, K.Q., NELSSSEN, J.L., GOODBAND, R.D., & TOKACH, M.D. Influence of weaning age and nursery diet complexity on growth performance and carcass characteristics and composition of high-health status pigs from weaning to 109 kilograms. **Journal of Animal Science**, v.74, n.12, p.2975, 1996.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, n.7, 2006.

- FANO, E., PIJOAN, C., DEE, S., DEEN, J. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.195-200, 2007.
- FENG, X., and JIA, A. Protective Effect of carvacrol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **Inflammation**, v.37, n.4, p.1091-1110, 2014
- GARCIA-MORANTE, B., SEGALÉS, J., FRAILE, L., PERES DE ROSAS, A., MAITI, H., COLL, T., SIBILA, M. Assessment of nebulization technology for gilt exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* as an acclimation strategy. **Journal of Swine Health and Production**, v.28, p.294-301, 2020.
- GARRIDO-MANTILLA, J., ALVAREZ, J., CULHANE, M., NIRMALA, J., CANO, J.P., TORREMORELL, M. Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. **BMC Veterinary Research**, v.15, n.61, 2019, 10p.
- GARZA-MORENO, L., SEGALÉS, J., PIETERS, M., ROMAGOSA, A., SIBILA, M. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **Veterinary Microbiology**, v.219, p.23-29, 2018.
- GONELIMALI, F. D., LIN, J., MIAO, W., XUAN, J., CHARLES, F., CHEN, M., HATAB, S. R. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.
- GUIMARÃES, D., AMARAL, G., MAIA, G., LEMOS, M.M., ITO, M., CUSTODIO, S. Suinocultura - estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **Agroindústria BNDES Setorial** 45, p.85-136, 2017.
- 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 Swine Health Production**, v.23, p.321–330, 2015.
- JAMROZ, D., WERTELEEKI, T., HOUSZKA, M., KAMEL, C. Influence of diet type on the inclusion of herbal origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v.90, p.255-268, 2006.
- JOHNSON, C. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1244-1255, 1997.
- JOHNSON, C. Batch farrowing for disease control. **2018 ISU James D. McKean Swine Disease Conference**, p.48-50, 2018.

- KIM, S., FAN, M., APPLGATE, T. Non ruminant nutrition symposium on natural phytobiotics for health of young animals and poultry: mechanisms and application. **Journal of Animal Science**, v.86. Suppl 14, p.38-39, 2008.
- LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J. NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.
- LE FLOC'H, N., LE BELLEGO, L., MATTE, J. J., MELCHIOR, D., SÈVE, B. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. **Journal of Animal Science**, v.87, n.5, p.1686-1694, 2009.
- LUDTKE, C.B., CIOCCA, J.R.P., DANDIN, T., BARBALHO, P.C., VILELA, J.A., COSTA, O.A.D. Abate humanitário de suínos. **Sociedade Mundial de Proteção Animal – WSPA Brasil**, Rio de Janeiro, 2010, 132p.
- LUDTKE, C.B., DIAS, C.P., DALLA COSTA, D.F.A., RIBAS, J.C., DALLA COSTA, O.A. Eutanásia de suínos em granjas: boas práticas para o bem-estar na suinocultura. **Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação, Brasília, 2019, 61p.
- MADEC, F., KOBISCH, M. Bilan lesion nel dès poumons de porcs charcutiers a l'abattoir. **Journées Recherche Porcine**, v.14, p.405-412, 1982.
- MAES, D., SEGALÉS, J. MEYNS, SILILA, M., PIETES, M., HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p.297-309, 2008.
- MAES, D., SIBILA, M., KUHNERT, P., PIETERS, M., HAESEBROUCK, F. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, p.110-124, 2018.
- MAROIS, C., GOTTSCHALK, M., MORVAN, H., FABLET, C., MADEC, F., KOBISCH, M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.135, n.3-4, p.283-291, 2009.
- MAROIS, C., DORY, D., FABLET, C., MADEC, F., KOBISCH, M. 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, p.1523-1533, 2010.
- MINION, F.C., et al. Multiphasic interactions of *Mycoplasma pulmonis* with erythrocytes defined by adherence and hemagglutination. **Infection Immunity**, v.44, p.394-400, 1984.

- MOORKAMP, L., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., & BEILAGE, E.G. Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3–6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.56, p.54-56, 2009.
- MORENO, A.M., SOJESTIANSKY, J., LOPEZ, A.C., SOBESTIANSKY, A.A.B. Colheita e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico. **EMBRAPA-CNPSA. Documentos 41**, Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1997, 30p.
- MORES, M.A.Z., OLIVEIRA FILHO, J.X., REBELATTO, R., KLEIN, C.S. BARCELLOS, D.E.N, COLDEBELLA, A., MORES, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.35, n.8, p725-733, 2015.
- NATHUES, H., DOEHRING, S., WOESTE, H., FAHRION, A.S., DOHERR, M.G., BEILAGE, E.G. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p.44-55, 2013.
- NATHUES, H., FOURNIE, G., WIELAND, B., PFIEFFER, D.U., STARK, D.C. Modelling the within-herd transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in closed pig herds. **Porcine Health Management**, v.2, n.10, p.1-14, 2016.
- NEUMANN, E., HALL, W.F. Disease control, prevention and elimination. **Disease of Swine**, 11th edition, p.123-157, 2019.
- NICKELL, M.B.S., TOOFILL, 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**, p.97-98, 2018.
- NICOLOSO, R.S., BARROS, E.C. Manual de dimensionamento e manejo de unidades de compostagem de animais mortos para granjas de suínos e aves. **EMBRAPA-CNPSA. Documentos 203**, Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 2019, 77p.
- NOSTRO, A., PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.7, p.28-35, 2012.
- OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031. **OECD Publishing**, Paris, 2022.
- OMONIJO, F.N.L., GONG, J., WANG, Q., LAHAYE, L., YANG, C. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. **Animal Nutrition**, v.4, p.126-36, 2018.
- OSTANELLO, F., DOTTORI, M., GUSMARA, C., LEOTTI, G., SALA, V. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.54, n.2, p.70-75, 2007.

- OLIVEIRA, P.A.V. Manual de manejo e utilização dos dejetos de suínos. **EMBRAPA-CNPSA. Documentos 27**, Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1993, 77p.
- PANTOJA, L.G., PETTIT, K., DOS SANTOS, L.F., TUBBS, R., PIETERS, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* genetic variability within a swine operation. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n.2, p.175-179, 2016.
- PALADINO, E.S., GABARDO, M.P., LUNARDI, P.N., MORÉS, N., GUEDES, M.C. Anatomopathological pneumonic aspects associated with highly pathogenic *Pasteurella multocida* in finishing pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.10, p.1091-1100, 2017.
- PASTORELLI, H., LE FLOC'H, N., MERLOT, E., MEUNIER-SALAUN, M. C., VAN MILGEN, J., MONTAGNE, L. Feed restriction applied after weaning has different effects on pig performance and health depending on the sanitary conditions. **Journal of Animal Science**, 90, n.3, 4866-4875, 2012.
- PIETERS, M., FANO, E., PIJOAN, C., DEE, S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. **Veterinary Microbiology** v. 134, p.261-266, 2009.
- PIETERS, M., FANO, E., PIJOAN, C., DEE, S. An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 74, p.157-160, 2010.
- PIETERS, M., PAINE, B., PRADO, C., ERTL, J., RENDAHL, A.K. Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. **Veterinary Microbiology**. v. 172, p.575-580, 2014.
- PIETERS, M. & MAES, D. *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: ZIMMERMAN, J.J., KARRIKER, L.A., RAMIREZ, A., SCHWARTZ, K.J., STEVENSON, G.W., ZHANG, J. **Disease of swine, 11th edition**, p.863-871, 2019.
- PIETERS, M. & FANO, E. *Mycoplasma hyopneumoniae* in gilts. **Veterinary Record**. v. 178, p.122-123, 2016.
- RABOBANK. Futuro da agricultura. O surgimento do empreendedor agrícola. Disponível em: <https://www.rabobank.com.br>. **Rabobank Brasil**, p.66-67, 2017.
- RAYMOND, B.B.A., TACCHI, J.L., JAROCKI, V.M., MINION, F.C., PADULA, M.P., DJORDJEVIC, S.P. P159 from *Mycoplasma hyopneumoniae* binds porcine cilia and heparin and is cleaved in a manner akin to ectodomain shedding. **Journal of Proteome Research**, 12(12), 5891-5903, 2013.

- RAZIN, S., YOGEV, D., & NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, n.4, p.1094-1156, 1998.
- ROBBINS, R.C., BETLACH, A.M., MONDRAGON-EVANS, M.R., PIETERS, M. Development of a herd-specific lung homogenate for exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. **Journal of Swine Health and Production**, v.27, n.4, p.221-227, 2019.
- RODRÍGUEZ, F., RAMÍREZ, G., SARRADELL, J., ANDRADA, M., & LORENZO, H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, n.4, p.306-312, 2004.
- ROOS, R.L., FANO, E., HOMWONG, N., PAYNE, B., PIETERS, M. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. **Veterinary Microbiology**, v.184, p.51-58, 2016.
- ROSATO, A., VITALI, C., DE LAURENTIS, N., ARMENISE, D., ANTINIETTA MILILLO, M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v.14, n.11, 727-732, 2007.
- ROSE N. & MADEC F. Occurrence of respiratory disease outbreaks in fattening pigs: Relation with the features of a densely and a sparsely populated pig area in France. **BioMed Central Veterinary Research**, v.33, p.179-190, 2002.
- SCHAEFER, R., RECH, R.R., SILVA, M.C., GAVA, D. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 61-73, 2013.
- SEYMOUR, L., DEUTSCHER, A., JENKINS, C., KUIT, T., FALCONER, L., MINION, F., WALKER, M. A processed multidomain *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.33971-33978, 2010.
- SIMIONATTO, S., MARCHIORO, S. B., MAES, D., DELLAGOSTIN, O. A. *Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v.165, n.3-4, 234-242, 2013.
- SINHORIN, A. L., COSTA, R. J., PREVIATO DO AMARAL, P. F. G., BELTRAMI, J. M., SÁ, T. C., CAETANO, I. C.S., OTUTUMI, L. K. Óleo essencial na dieta de leitões na fase de creche. **Arquivo Ciência Vet. Zool. UNIPAR**, Umarama, v.20, n.3, p.147-151, 2017.
- SIBILA, M., CALSAMIGLIA, M., VIDA, D., BADIELLA, L., ADAZ, A., JENSEN, J.C. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. **Canadian Veterinary Research**, v.68, p.12-18, 2004.

- SIBILA, M., PIETERS, M., MOLITOR, T., MAES, D., HAESEBROUCK, F., SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, v.181, n.3, 221-231, 2009.
- SILVA, F.M.F., CASTRO, L.A., SILVA JUNIOR, A., MORAES, M.P., MOREIRA, M.A.S., ALMEIDA, M.R. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.149-155, 2009.
- SILVA, G.S., YESKE, P., MORRISON, R.B., LINHARES D.C.L. 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.
- SILVA, E.R., de CARVALHO, F.O., TEIXEIRA, L.G.B., SANTOS, N.G.L., FELIPE, F.A., SANTANA, H.S.R., NUNES, P.S. Pharmacological effects of carvacrol in vitro studies: A review. **Current Pharmaceutical Design**, v.24, n.29, p.3454-3465, 2018.
- SOBESTIANSKY, J. Aplicação de medicamentos em suínos. **EMPRAPA-CNPSA, Circular Técnica 2**, Concórdia, 1980, 19p.
- SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D.E.S.N., MORES, N., CARVALHO, D.F., OLIVIERA, S. **Clínica e Patologia Suína**, 2. ed., Goiânia, p.359-362, 1999.
- SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D.E.S.N. **Doença dos Suínos**, 2ed., Goiânia, p.959, 2012.
- SOSA, C. BLOIS, A., IBANEZ, F., TAMIOZZO, P. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Mendoza province. **Revista Argentina de Microbiología**, v.51, n.3, p.229-233, 2019.
- SORENSEN, V., AHRENS, P., BARFOD, K., FEENSTRA, A.A., FELD, N.C., FRIIS, N.F., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N.E., PEDERSEN, M.W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assay. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.23-34, 1997.
- SPOHEIM, A., ALVAREZ, J., FANO E., SCHMALING, E., DEE, S., HANSON, D., WEZELL, T., PIETERS, M. Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection, **Veterinary Microbiology**. v.241, 2020.
- TAJIMA, M., YAGIHASHI, T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. **Infection and Immunity**, v. 37, p.1162-1169, 1982.

- TAKEUTI, K.L. BARCELLOS, D.E.S.N., DE LARA A.C., KUNRATH, C.F., PIETERS, M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. **Veterinary Microbiology**. v.203, p.215-220, 2017a.
- TAKEUTI, K.L. BARCELLOS, D.E.S.N., ANDRADE, C.P., ALMEIDA, L.L., PIETERS, M. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. **Veterinary Microbiology**. v.208, p.18-24, 2017b.
- TAKEUTI, K.L, FORNER, R.A.N., MAZZAROLLO, A., MICHAELSEN, T.R., NAGAE, R.Y., BARCELLOS, D.E.S.N., BORTOLOZZO, F.P. Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em swabs laríngeos e mucotraqueobrônquico através de PCR em tempo real. **XII Simpósio Internacional de Suinocultura: Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos**, Porto Alegre, p.232-233, 2019.
- TAKEUTI, K.L, MICHAELSEN, T.R., SABEDOT, C., NAGAE, R.Y., FORNER, R.A.N., MAZZAROLLO, A., BARCELLOS, D.E.S.N., PIETERS, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* detection by PCR in naturally infected finishing pigs. **Journal of Microbiological Methods** v.197, 10647, 2022.
- TAKEUTI, K.L, BETLACH, A.M., FANO E., SCHWARTZ, M., YAROSF, J., WAYNE, S., SCHMALING, E., BARCELLOS, D.E.S.N., PIETERS, M. The effect of gilt flow management during acclimation on *Mycoplasma hyopneumoniae* detection. **Veterinary Microbiology**, v.276, 109554, 2023.
- TAN, C., WEI, H., SUN, H., AO, J., LONG, G., JIANG, S., PENG, J. Effects of dietary supplementation of oregano essential oil to sows on oxidative stress status, lactation feed intake of sows, and piglet performance. **BioMed Research International**, 2015
- THACKER, E.L., THACKER, B.J, KUHN M, HAWKINS, P.A., WATERS, W.R. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.1384-1389, 2000a.
- THACKER, E.L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, n.5, 2004.
- THACKER, E. L.; MINION, F. C. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMANN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine 10th edition**, Ames: Wiley-Blackwell, p.779-797, 2012.
- VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., de KRUIF, A. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.11, p.4470-4472, 2004.

- VICCA, J., MAES, D., JONKER, L., de KRUIF, A., HAESEBROUCK, F. Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **The Veterinary Record**, v.156, p.606-610., 2005.
- VILLARREAL, I., MEYNS, T., DEWULL, J., VRANCKX, K.L., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., MAES, D. 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., *Mycoplasma hyopneumoniae* diversity in pigs. **Thesis (Doctor of Veterinary Science – PhD)** - Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 2011, Belgium, 2011. 124p.
- VRANCKX K, MAES, D., SACRISTAN, R.D.P., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F.A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.315-321, 2012.
- XU, J., ZHOU, F., JI, BP, PEI, R.S. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p.174-179, 2008.
- ZENG, Z., ZHANG, S., WANG, H., PIAO, X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.6, n.7, 2015.
- ZOU, Y., WANG, J., PENG, J., WEI, H. Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-13, 2016.
- YANG, C., CHOWDHURY, M., HUO, Y., GONG, J. Phytogetic compounds as alternatives to infeed antibiotics: potentials and challenges in application. **Pathogens**, v.4, n.1, p.137-156, 2015.