

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

**“ESTUDO ETIOLÓGICO E PATOLÓGICO DE PNEUMONIAS EM JAVALIS
CRIADOS DE FORMA CONFINADA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL”**

NATALHA BIONDO

PORTO ALEGRE

2012

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

“ESTUDO ETIOLÓGICO E PATOLÓGICO DE PNEUMONIAS EM JAVALIS CRIADOS
DE FORMA CONFINADA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL”

Autor: Natalha Biondo

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva

Orientador: Prof. David E. S. N. de Barcellos

PORTO ALEGRE

2012

NATALHA BIONDO

**ESTUDO ETIOLÓGICO E PATOLÓGICO DE PNEUMONIAS EM JAVALIS CRIADOS
DE FORMA CONFINADA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovado em 08 de Março de 2012.

APROVADO POR:

David Emilio Santos Neves de Barcellos
Orientador e Presidente da Comissão

David Driemeier
Membro da Comissão

Janice Reis Ciacci Zanella
Membro da Comissão

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida e proteção;

A UFRGS e PPGCV pela oportunidade do curso;

A Capes pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de mestrado;

Aos meus familiares:

Meu companheiro Valdomiro, por todo amor, carinho, compreensão e acima de tudo incansável incentivo. Por ser alguém que torna minha vida muito melhor e especial;

Aos meus pais, Mauro e Odete pela constante educação, exemplos de vida e apoio. Ao meu irmão Mauro Mauricio, pelo seu jeito incomparável de ser, o melhor irmão que eu poderia ter;

A família Genari pelo carinho acolhedor e incentivo que foram fundamentais. A minha vó Irma e tia Ivete pela torcida e apoio;

Aos professores:

Ao meu orientador David e aos professores Fernando, Ivo e Mari, pelos ensinamentos e oportunidades, e principalmente pelo incentivo, amizade, confiança e desafios que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente;

Aos queridos:

Aline, João e Paulo, a melhor turma que eu poderia ter. Pela amizade, conhecimentos compartilhados, boas discussões em sala de aula, prontidão em auxiliar no que fosse preciso, pela descontração, cuias de chimarrão e bom convívio. Em especial, ao João, por ter sido sempre muito atencioso;

Djane, profissional que admiro em especial. Por todo o apoio e por ser uma das primeiras pessoas a me incentivar a cursar o mestrado;

Daiane, Luiza e Bernardo, habitantes do apto 202, pelo companheirismo e boa convivência;

Ao Setor de Suínos:

Colegas da pós-graduação pelos bons momentos vividos e conhecimentos compartilhados, todos, sem exceção foram importantes;

Aos bolsistas e estagiários, da mesma forma, agradeço a todos;

Pelos tantos pedidos de “socorro” atendidos, agradeço a Alana, Aline, Carine, Cristina, Diogo M., João, Karine, Lídia, Paulo, Thais e Thomas.

Na execução dos experimentos:

A todos que me auxiliaram, sem exceção, muito obrigada!

Alana, Carine, João e Karine pessoas sem as quais não seria possível a execução do trabalho, pela amizade, descontração, tolerância mútua, empenho e dedicação;

A Sandra Borowsky pelo auxílio nas etapas iniciais de elaboração da metodologia;

Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular da UFRGS, em especial ao professor David Driemeier, colegas Carol Andrade, Laura Almeida, Luiza Amaral e Priscila Zlotowsky;

Equipe da Virologia Suína e Patologia do Laboratório de Sanidade da EMBRAPA – Cnpsa, em especial a Janice Zanella, Rejane Schaefer, Marcos Morés, Nelson Morés, Camila, Danielle, Franciele, Kelen, Marisete, Neide e Simone;

A Cooperativa Ouro do Sul pela oportunidade da coleta do material;

Enfim, a todas as pessoas que de uma forma ou outra, colaboraram para meu crescimento profissional e pessoal. Aos que acreditaram em mim, me apoiaram e incentivaram!

“Sem ambição nada se começa. Sem esforço, nada se completa”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

ESTUDO ETIOLÓGICO E PATOLÓGICO DE PNEUMONIAS EM JAVALIS CRIADOS DE FORMA CONFINADA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

As doenças respiratórias são muito comuns na produção intensiva de suínos, já em javalis são escassas informações sobre prevalência, etiologia e apresentação clínico-patológica destas enfermidades. No entanto, a presença de patógenos respiratórios comuns entre javalis selvagens e confinados e suínos domésticos já foi relatada. Este trabalho descreve as principais lesões macroscópicas e histológicas de pneumonias de javalis e os agentes comumente envolvidos. Foram examinados pulmões de javalis, ao abate, provenientes de criatórios comerciais e a principal lesão macroscópica foi consolidação crânio-ventral dos lobos craniais e médios e lesões crônicas cursando com hiperplasia linfóide na histologia. O principal agente bacteriano detectado foi o *Mycoplasma hyopneumoniae* (58,6%). Outros patógenos bacterianos detectados foram *Actinobacillus pleuropneumoniae* (48,8%), *Haemophilus parasuis* (49,6%), *Mycoplasma hyorhinis* (41,3%), *Pasteurella multocida* (9,1%) e *Streptococcus suis* (9,1%). Na segunda parte do trabalho, a pesquisa de patógenos virais foi direcionada para o Vírus da influenza suína (VIS) com objetivo de estudar o envolvimento em pneumonias de javalis de criatórios e a relação com agentes bacterianos encontrados. O vírus pandêmico A/H1N1/2009 foi detectado em 18,3% (11/60) e sua identidade foi confirmada por sequenciamento. A carga viral para H1N1 clássico variou de 4,58 a 6275 cópias/ μ L e para o H1N1 pandêmico, de 4,65 a 3863 cópias/ μ L. Nenhuma amostra apresentou título viral após a inoculação em ovos embrionados. As lesões histológicas principais foram broncopneumonia crônica difusa e pneumonia intersticial mononuclear leve, além de hiperplasia linfóide. As amostras positivas por RT-PCR para o VIS para o pH1N1 foram testadas por IHQ, sendo todas negativas para influenza A, mas todas eram positivas para *M. hyopneumoniae*. Quando testadas por bacteriologia, 18,2% das amostras foram positivas para *P. multocida*. O estudo mostrou que as pneumonias em javalis de criatório apresentaram lesões e patógenos associados similares aos encontrados em suínos domésticos ao abate. Este é o primeiro relato da infecção pelo vírus pH1N1 em javalis no Brasil.

Palavras-chave: javali, pneumonia, consolidação pulmonar, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Vírus da influenza suína.

ABSTRACT

ETIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL STUDY OF PNEUMONIA IN CAPTIVE WILD-BOARS IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL

Respiratory diseases are very common in swine intensive production, although in wild-boars the knowledge of the prevalence, etiology and clinic-pathological presentation of these diseases are very limited. However, the presence of common respiratory pathogens among wild-boar, captive wild-boar and domestic pigs has been reported. This paper describes the main macroscopic and histologic pneumonic lesions of captive wild-boars and pathogens commonly involved. Captive wild-boar lungs at slaughter were examined and the main macroscopic lesion observed was cranio-ventral consolidation of cranial and middle lobes and chronic lesions associated with lymphoid hyperplasia by histology. The main bacterial pathogen detected was *Mycoplasma hyopneumoniae* (58.6%). Other bacterial pathogens detected were *Actinobacillus pleuropneumoniae* (48.8%), *Haemophilus parasuis* (49.6%), *Mycoplasma hyorhinis* (41.3%), *Pasteurella multocida* (9.1%) and *Streptococcus suis* (9.1%). In the second part of this work, the survey of viral pathogens was directed to swine influenza virus (SIV) in order to study the involvement in captive wild-boar pneumonias and the relation with bacterial pathogens. The A/H1N1/2009 pandemic virus was detected in 18.3% (11/60) and its identity was confirmed by sequencing. The classical H1N1 viral load ranged from 4.58 to 6275 copies/uL and the pandemic H1N1, from 4.65 to 3863 copies/uL. No samples had viral titers after inoculation in embryonated eggs. The main histological lesions were chronic diffuse bronchopneumonia and interstitial mononuclear pneumonia as well as mild lymphoid hyperplasia. Samples positive to pH1N1 were assayed by IHC for SIV, all with negative results, and to *M. hyopneumoniae*, all were positive. When assayed by bacteriology, 18.2% of samples were positive to *P. multocida*. This study showed that pneumonia in captive wild-boar had similar lesions and associated pathogens were similar to those found in domestic pigs at slaughter. This is the first report of pH1N1 virus infection in captive wild-boars in Brazil.

Key-words: captive wild-boar, pneumonia, lung consolidation, *M. hyopneumoniae*, swine influenza virus.

LISTA DE TABELAS

Tabelas inseridas no Artigo I		Página
Tabela 1.	Localização das lesões macroscópicas identificadas em 121 pulmões de javalis com pneumonia, de acordo com a classificação histopatológica das áreas de consolidação	33
Tabela 2.	Descrição das principais lesões macroscópicas e histológicas identificadas em 121 pulmões de javalis com pneumonia examinados, de acordo com a classificação histopatológica de lesões de consolidação	34
Tabela 3.	Percentual da presença de agentes bacterianos detectados por exame bacteriológico ou PCR e sua associação com a hiperplasia do BALT e broncopneumonia supurativa	35
Tabela 4.	Agentes bacterianos detectados por exame bacteriológico ou PCR e sua associação com a classificação histopatológica de lesões de consolidação em 121 pulmões	36
Tabelas inseridas no Artigo II		
Tabela 1.	Tipos de vírus Influenza A pH1N1 com a maior identidade de sequências de nucleotídeos com o vírus pH1N1 detectado neste estudo, conforme determinado por pesquisa BLAST no NCBI	48
Tabela 2.	Principais lesões histopatológicas, resultados de IHQ e bacteriologia nas 11 amostras positivas por RT-PCR	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. ENFERMIDADES RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS E JAVALIS	11
2.2. PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS COM PNEUMONIAS EM SUÍNOS E JAVALIS	12
2.2.1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	12
2.2.2. <i>Pasteurella multocida</i>	14
2.2.3. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	16
2.2.4. <i>Haemophilus parasuis</i>	17
2.3. OUTROS AGENTES ENVOLVIDOS EM PNEUMONIA EM SUÍNOS E JAVALIS	18
2.3.1. <i>Streptococcus suis</i>	18
2.3.2. <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	19
2.4. VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA	20
3. ARTIGO I	24
4. ARTIGO II	40
5. DISCUSSÃO GERAL	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias estão entre as mais prevalentes na suinocultura industrial e são responsáveis por perdas decorrentes de uma complexa interação entre agentes patogênicos, suscetibilidade animal, falhas de manejo e condições ambientais. As principais perdas decorrem do efeito negativo em índices produtivos, gasto com medicamentos, mortalidade e condenação ou desvio de carcaças. A etiologia das pneumonias é complexa e os patógenos primários envolvidos são principalmente bacterianos ou virais.

As doenças respiratórias em suínos domésticos são bem conhecidas e estudadas, no entanto, quando nos referimos a estas enfermidades em javalis (*Sus scrofa*) criados em confinamento (criatórios), são poucas as informações encontradas. A intensificação da produção comercial de javalis, devido ao aumento do consumo de carne exótica, tem despertado maior interesse econômico na atividade. Neste contexto, há necessidade de estudos mais aprofundados tanto da etiologia como epidemiologia das enfermidades respiratórias nesta espécie.

A população de javalis selvagens tem aumentado consideravelmente no estado do Rio Grande do Sul (RS), de 1991 a 2006 foi relatada a presença destes animais em 213 municípios, o que representa 26% da área territorial do estado (FONSECA et al., 2011). A produção de javalis em criatórios, de forma semi-intensiva, ainda é pouco expressiva quando comparada à suinocultura industrial. Segundo dados do Sindicato das Indústrias de Produtos Suínos do RS (SIPS/RS), em 2011, foram abatidos 1.325 javalis sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF), no estado do RS.

Os javalis confinados em criatórios são animais selvagens criados de forma intensiva. Partindo deste princípio, podem atuar como reservatório, ou seja, albergar agentes patogênicos com capacidade infectante e transmiti-los a outras espécies (RUIZ-FONS et al., 2008). Como as mesmas doenças infecciosas podem ocorrer em espécies selvagens e domésticas, os javalis e os suínos domésticos por terem um ancestral comum, podem ser acometidos por patógenos comuns.

O estado do RS, local do estudo, é o segundo maior produtor de suínos do Brasil, com aproximadamente 590 mil toneladas de carne suína produzidas em 2010 (ABIPECS, 2011). A densidade de suínos é relativamente alta no estado, o que favorece a transmissão de patógenos, principalmente em áreas onde existe proximidade de criatórios de javalis e granjas de suínos.

Há carência de informações, no Brasil e no mundo, sobre doenças infecciosas em populações de javalis criados em cativeiro. Existe pouco conhecimento sobre quais são as enfermidades respiratórias, como se apresentam os quadros clínico-patológicos, dados sobre a epidemiologia das doenças na espécie e quais as possíveis formas de profilaxia. Os estudos disponíveis referem-se á populações selvagens, principalmente na Europa e a maioria contempla informações obtidas através de análises sorológicas (VICENTE et al., 2002; MAROIS et al., 2006; REINER et al., 2010).

O presente estudo teve por objetivo relatar as características anatomopatológicas e identificar a etiologia de casos de pneumonias em javalis abatidos em um matadouro-frigorífico do estado do Rio Grande do Sul.

A dissertação é composta por três partes. Inicialmente, é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre os principais agentes etiológicos de pneumonias em suínos domésticos, e achados relacionados em populações selvagens e de criatórios de javalis. A segunda parte (artigo I) inclui um artigo científico onde são contemplados achados etiológicos e patológicos de pneumonias bacterianas de javalis ao abate e a relação entre patógenos e lesões. Na terceira parte (artigo II), é relatada a presença do vírus da influenza e a relação com agentes bacterianos encontrados em pneumonias de javalis. As populações do artigo I e II foram coletadas em ocasiões diferentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENFERMIDADES RESPIRATÓRIAS EM SUÍNOS E JAVALIS

As doenças respiratórias estão entre as mais prevalentes na produção intensiva de suínos e apresentam etiologia multifatorial, no qual, agentes infecciosos, ambientais e de manejo estão envolvidos. As causas infecciosas mais comuns de pneumonias em suínos domésticos são bacterianas e virais. Em geral, o *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* e patógenos virais como o vírus da influenza são os agentes primários; enquanto os secundários são bactérias, como a *Pasteurella (P.) multocida*.

Inquéritos sorológicos em javalis selvagens, identificaram a ocorrência de infecções por patógenos respiratórios encontrados nos suínos domésticos, porém em javalis provenientes de criatórios os relatos são escassos. A partir de um surto de pneumonia observado por Ecco et al. (2009) em um criatório de javalis, foram encontradas evidências de que as enfermidades respiratórias aconteciam de forma semelhante nas duas espécies. Na

ocasião, os autores observaram que a sintomatologia clínica e os achados patológicos eram semelhantes aos observadas em suínos domésticos, quando a infecção primária era devido ao *M. hyopneumoniae*.

Na revisão que será apresentada a seguir, será tomado como base o que já foi relatado para populações domésticas de suínos e populações selvagens de javalis.

Em suínos domésticos, o agente mais frequentemente relacionado com pneumonias é o *M. hyopneumoniae* (THACKER, 2006; REDONDO et al., 2009). Esse agente atua destruindo o sistema ciliar do epitélio respiratório, o qual constitui um importante mecanismo de defesa. Além disso, exerce efeito mitogênico em linfócitos, ocasionando a hiperplasia do tecido linfóide associado aos bronquíolos (BALT) e atelectasia pulmonar. A capacidade de imunomodulação torna o agente capaz de evadir-se da resposta imune, a infecção torna-se crônica, facilitando a ocorrência de infecções secundárias (THACKER, 2006; PIETERS et al., 2009). A atuação conjunta de *M. hyopneumoniae* com outros patógenos bacterianos e virais determina um quadro infeccioso denominado “complexo de doenças respiratórias dos suínos” (HANSEN et al., 2010).

Além do *M. hyopneumoniae*, podem atuar como agentes primários de pneumonias em suínos, o vírus da influenza, circovírus suíno tipo 2, vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína e agentes bacterianos, como o *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* (BOSSÉ et al., 2002; THACKER, 2006; HANSEN et al., 2010). Os agentes oportunistas ou secundários levam à evolução para uma forma de pneumonia mais grave, com lesões extensas, sintomatologia grave, podendo cursar com aumento significativo de mortalidade. Em suínos domésticos, os principais agentes oportunistas são *Haemophilus (H.) parasuis*, *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus (S.) suis* e *Actinobacillus suis* (THACKER, 2006).

2.2. PRINCIPAIS AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS COM PNEUMONIAS EM SUÍNOS E JAVALIS

2.2.1. *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae é o agente causador da pneumonia micoplásmica suína (anteriormente designada pneumonia enzoótica suína), uma enfermidade crônica amplamente distribuída nas criações de suínos. O caráter crônico da enfermidade acarreta sérios efeitos imunodepressores, perdas econômicas devido ao baixo desenvolvimento dos animais, piora na

conversão alimentar, baixo ganho de peso diário e predisposição á infecções secundárias (THACKER, 2006; REDONDO et al., 2009).

A doença pode afetar clinicamente leitões a partir das seis semanas de idade, mas ocorre mais frequentemente a partir da entrada na recria. A transmissão ocorre por contato direto, especialmente de animais mais velhos para os mais novos e por contato indireto (THACKER, 2006). Através da inoculação experimental, Otake et al. (2010) verificaram a disseminação por até 9,2 km do *M. hyopneumoniae* transportado por aerossóis por até 9,2 km.

O processo de patogênese desse gênero inclui: adesão, colonização, citotoxicidade, cilostase, competição por substrato, evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro. Este processo predispõe à colonização por bactérias oportunistas. Ainda, o agente altera a função de macrófagos alveolares, diminuindo a ação fagocítica destes e estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (THACKER, 2006).

A morbidade é alta e a mortalidade é baixa. Uma forma de tosse não produtiva é o principal sinal clínico. Tem início de forma gradual e se estende por semanas ou meses, sendo a maior intensidade observada na recria e terminação. O crescimento dos animais é afetado e a mortalidade, quando ocorre, é em decorrência das infecções secundárias (THACKER, 2006). Através da inoculação experimental, Fano et al. (2005) observaram o início da sintomatologia de tosse 14 dias pós-infecção nos animais inoculados; naqueles em contato direto e indireto com estes, os sinais iniciaram até 42 dias após a exposição.

As lesões compreendem áreas de consolidação na porção crânio-ventral dos lobos craniais, médios, caudais e intermediário. A aparência mais comum da lesão é de atelectasia com consistência firme. Nos brônquios e bronquíolos, o exsudato é catarral e os linfonodos mediastínicos e brônquicos podem aumentar de tamanho (THACKER, 2006).

Microscopicamente, a lesão principal é pneumonia broncointersticial com hiperplasia de BAL. Lesões iniciais consistem de pequenos acúmulos de neutrófilos no lúmen e ao redor das vias aéreas, leve necrose de epitélio e perda de cílios. Pode ocorrer edema fluído nos alvéolos com hiperplasia de pneumócitos tipo 2 e expansão dos septos interalveolares. O infiltrado característico é de neutrófilos, células mononucleares e linfócitos nos vasos e ao redor de brônquios e bronquíolos. Em casos crônicos da doença, observa-se hiperplasia linfóide peribronquial, peribronquiolar e perivascular, alvéolos colapsados e enfisema (THACKER, 2006; REDONDO et al., 2009).

Em populações selvagens de javalis, já foi relatada desde a ausência de anticorpos até 58% de animais soropositivos (VICENTE et al., 2002; MAROIS et al., 2006; SIBILA et al., 2010). A detecção do antígeno em pulmão, através da reação em cadeia da polimerase

(PCR), em dois estudos, demonstrou cerca de 9% de positivos (MAROIS et al., 2006; SIBILA et al., 2010). Lesões histológicas compatíveis com infecção por *M. hyopneumoniae* foram observadas em 29% (18/63) dos javalis examinados, entretanto o antígeno foi detectado em apenas duas amostras. Não é possível descartar a ocorrência da doença na forma sub-clínica ou crônica, uma vez que não foram observadas lesões macroscópicas e a detecção de antígeno foi baixa (SIBILA et al., 2010). A longa duração do estado infeccioso (PIETERS et al., 2009 detectaram antígenos por até 214 dias pós infecção em suínos) é uma característica da infecção que poderia explicar a presença de um número baixo mas constante de animais positivos num plantel. Animais portadores, ou com infecção crônica que albergam o agente nas vias aéreas podem representar risco para populações de suínos domésticos, uma vez que podem atuar como reservatório e eventuais difusores da infecção.

No Brasil, em rebanhos comerciais de javalis, Ecco et al. (2009) relataram um caso de pneumonia micoplásmica. A sintomatologia presente era muito semelhante à relatada em suínos domésticos, com atraso no desenvolvimento corporal, diminuição do apetite, letargia, tosse e dispneia. As lesões eram de consolidações típicas de broncopneumonia lobular com coloração vermelho-escuro nos lobos craniais e intermediário e terço ventral dos lobos caudais.

2.2.2. *Pasteurella multocida*

P. multocida é o agente causador da rinite atrófica progressiva dos suínos e da pasteurelose pulmonar. Quadros pneumônicos são comuns em associação com o *M. hyopneumoniae*, principalmente no final da fase de terminação, e quando associada com outros agentes primários de pneumonia ou outros fatores imunodepressores (CIPRIAN et al., 1988; DAVIES et al., 2003; PIJOAN, 2006; ROSS, 2007; HANSEN et al., 2010).

Devido algumas dificuldades na reprodução experimental da doença, tem-se relacionado o patógeno com uma ação secundária em casos de pneumonia. Ciprian et al. (1988) inocularam suínos com *M. hyopneumoniae* e *P. multocida* e observaram um sinergismo da ação dos patógenos. A inoculação prévia de *M. hyopneumoniae* favorece a colonização e dano do parênquima pulmonar por outros agentes. No entanto, o papel da *P. multocida* com o possível agente primário vem sendo estudado. O trabalho de Kich et al. (2007) demonstrou, através da inoculação experimental, que o agente é capaz de desenvolver doença clínica e graves lesões pulmonares.

P. multocida é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo e são descritos cinco sorotipos capsulares, sendo A, B, D e F encontrados em suínos. Foram descritos ainda, 16 sorotipos somáticos e os comumente detectados em suínos são o 3 e 5 (PIJOAN, 2006). O agente possui como fatores de virulência: cápsula, citoaglutininas, fímbrias, lipopolissacarídeos e dermatoxina (PIJOAN, 2006; ROSS, 2007).

Cepas que causam pneumonia, na maioria das vezes, não são toxigênicas e os sorotipos mais comuns são o A em casos de pneumonia e o D nos casos de rinite atrófica (DAVIES et al., 2003; MORÉS, 2006; PIJOAN, 2006; ROSS, 2007). Em casos de pneumonia, trabalhos relatam a maioria dos isolados pertencentes ao tipo capsular A (DAVIES et al., 2003; BETHE et al., 2009; HERES, 2009). Ocorrência do tipo capsular D em maior proporção que o A foi relatado por Morés (2006), entretanto, de modo geral, a identificação do tipo D em casos de pneumonia vem aumentando.

O agente está presente em praticamente todos os rebanhos e pode ser isolado das narinas e tonsilas de animais saudáveis. O contato focinho-focinho parece ser a forma mais comum de infecção. Uma vez estabelecido no organismo do suíno, o lipopolissacarídeo da bactéria estimula uma rápida reação do hospedeiro, com liberação de citocinas inflamatórias e reação supurativa caracterizada por infiltrado de neutrófilos. Os sinais clínicos variam em severidade de acordo com a cepa envolvida, o estado imune do animal e grau de desafio ambiental (CIPRIAN et al., 1988; PIJOAN, 2006).

Os sinais clínicos e lesões são mais comuns nas fases finais de crescimento e terminação. Incluem tosse, respiração abdominal e pleurite, sendo diferenciados de quadros de pleuropneumonia causados pelo *A. pleuropneumoniae*, porque nestes a morte súbita é mais prevalente. Na forma crônica, observa-se tosse e dispneia (PIJOAN, 2006).

As lesões são consolidações crânio-ventrais com distribuição, principalmente, na porção anterior dos lobos caudais, com coloração vermelha a verde acinzentado. Em casos severos pode ocorrer pleurite, abscessos, adesões de pleura, deposição de fibrina e acúmulo de líquido na cavidade torácica. A lesão histológica caracteriza-se por uma broncopneumonia severa com hiperplasia do epitélio alveolar, abundante presença de neutrófilos com exsudato mucopurulento no lúmen dos brônquios e ocasionalmente necrose multifocal (CIPRIAN et al., 1988; PIJOAN, 2006; KICH et al., 2007; PORS et al., 2011). O agente pode ser observado em áreas de tecido necrótico em pneumonias necróticas e em pneumonias exsudativas, em alvéolos e bronquíolos através da hibridização “in situ” (PORS et al., 2011).

Em javalis, não foram encontrados relatos do envolvimento de *P. multocida* em enfermidades respiratórias de populações selvagens e/ou domésticos.

2.2.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. pleuropneumoniae é um agente bacteriano de pneumonia com distribuição mundial, atuando como agente primário de pleuropneumonia necro-hemorrágica, afetando com maior frequência animais de seis a oito semanas de idade. As perdas econômicas ocorrem devido à alta mortalidade, redução da produtividade, gastos com medicamentos e condenações de vísceras e carcaça em abatedouros (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006; MAES, 2011).

É um cocobacilo encapsulado, Gram-negativo e é parte da microbiota normal dos suínos. Pode ser classificado em dois biótipos conforme seu requerimento do precursor de crescimento nicotinamida adenosina nucleotídeo (NAD ou fator V). O biótipo 1 que é dependente de NAD e agrupa os sorotipos 1 ao 12 e o 15, e o biótipo 2 que é NAD independente e inclui os sorotipos 13 e 14 (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006; REINER et al., 2010). No Brasil, os sorotipos identificados em amostras históricas (1993 a 2006) foram: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 12, e os mais prevalentes, 5, 3, 10 e 6 (KUSCHIISHI et al., 2007). Segundo os autores, conhecer os sorotipos de uma região é fundamental na profilaxia da enfermidade, pois mais de um sorotipo pode estar presente e as vacinas não fornecem proteção contra todos os sorovares.

A transmissão ocorre por contato direto, indireto e introdução de portadores sadios no rebanho. Todos os sorotipos podem causar doença, no entanto, há diferenças de patogenicidade devido à produção de toxinas. A doença pode se desenvolver sob forma super-aguda à crônica, dependendo do sorotipo envolvido, carga bacteriana, desafio ambiental e estado imune do rebanho (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006; MAES, 2011).

Após aderir aos cílios dos bronquíolos terminais e células epiteliais dos alvéolos, o *A. pleuropneumoniae* evade a resposta imune, causa dano tecidual e produz toxinas denominadas “Apx”. Estas são responsáveis pelos efeitos clínico-patológicos e são classificadas de acordo com a intensidade da sua ação hemolítica e citotóxica. A Apx I tem ação hemolítica e citolítica forte; Apx II tem ação hemolítica fraca e citotóxica moderada; Apx III não produz hemólise e é fortemente citotóxica e a Apx IV fracamente hemolítica e ação citotóxica não determinada (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006; MAES, 2011).

Os sinais incluem febre, tosse, espirro, dispneia, anorexia e relutância em se mover. Em casos terminais, há saída de conteúdo espumoso sanguinolento pelas narinas e boca.

Animais sobreviventes à infecção geralmente apresentam áreas necróticas ou abscessos encapsulados no parênquima pulmonar e animais cronicamente infectados ou portadores sadios podem carrear o agente nas tonsilas (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006; MAES 2011).

As lesões são nódulos necro-hemorrágicos, focais e bem demarcadas, geralmente bilaterais nos lobos pulmonares. Pode acontecer edema, hemorragia, necrose, fluído serosanguinolento com coágulos de fibrina na cavidade torácica, pleurite fibrinosa difusa, adesão de pleura e pericardite. Na histopatologia, é observado edema da parede alveolar, congestão dos capilares, exsudato fibrinoso e infiltrado de polimorfonucleares. Podem também ser observadas áreas necróticas e degeneradas, exsudato purulento nos brônquios, agregação de plaquetas na parede alveolar e microcolônias do agente nos alvéolos (BOSSÉ et al., 2002; GOTTSCHALK & TAYLOR, 2006).

Em javalis, o *A. pleuropneumoniae* já foi identificado em pulmões de animais selvagens sadios e sem lesões macroscópicas. A presença do agente em amostras de tonsila e pulmões foi de 34,8% e 6,4%, respectivamente (REINER et al., 2010). O baixo número de resultados positivos no pulmão neste estudo poderia ser devido à existência de falsos negativos e a maior detecção nas tonsilas, pelo estado de portador de cepas apatogênicas ou de baixa virulência.

2.2.4. *Haemophilus parasuis*

É o agente etiológico da doença de Glässer, caracterizada por polisserosite. O *Haemophilus* atua sozinho ou em associação com outros agentes. É um bacilo Gram-negativo, pleomórfico, dependente de NAD ou fator V para crescimento. São conhecidos 15 diferentes sorotipos e um mesmo animal ou rebanho pode ser afetado por mais de um sorotipo (SANTOS et al., 2007). É parte da microbiota saprófita, pode ser isolado de secreções nasais de animais sadios na primeira semana de vida ou de pulmões, sendo mais frequente naqueles com lesões do que nos indivíduos saudáveis (OLIVEIRA & PIJOAN, 2004; RAPP-GABRIELSON et al., 2006).

No Brasil, em suínos domésticos, os sorotipos identificados com maior frequência, em ordem de ocorrência, foram: 4, 5, 14, 13 e 2, e 39% das cepas foram consideradas não-tipáveis (CASTILLA et al., 2011). Também no Brasil, Macedo et al. (2011) identificaram como prevalentes os sorotipos 1, 2, 4, 5, 6, 9, 12 e 14. O sorotipo 4 foi o predominante e 60,3% (38/63) das amostras foram não-tipáveis.

A apresentação clínica depende da serosa envolvida. Em geral, a sintomatologia inclui febre, anorexia, dispneia, dor, claudicação, inchaço em articulações, tremores, incoordenação, cianose, decúbito e morte. Nos leitões sem imunidade o surto é desencadeado poucos dias após a exposição. Macroscopicamente, observa-se exsudato serofibrinoso ou fibrinopurulento em serosas e, microscopicamente, exsudato com fibrina, neutrófilos e poucos macrófagos. O isolamento da bactéria é importante no diagnóstico, porém por ser uma bactéria fastidiosa nem sempre se tem sucesso (RAPP GABRIELSON et al., 2006; SANTOS et al., 2007). A relação do *Haemophilus* com pleurite já foi bem estabelecida, mas como causador de pneumonias seu papel ainda é pouco conhecido.

Em javalis selvagens, investigações sorológicas demonstraram desde a ausência de anticorpos para *H. parasuis* até 18% de soropositivos (VICENTE et al., 2002; VENGUST et al., 2006). Nesta espécie, Reiner et al. (2010) detectaram o patógeno mais frequentemente em tonsilas que pulmões, 69,1% e 40,4%, respectivamente. Olvera et al. (2007) isolaram apenas duas (4,8%) cepas de *H. parasuis* de suabes nasais de javalis selvagens, ambas pertenciam ao sorotipo 2, considerado moderadamente virulento. Os isolados podem ser parte da microbiota normal e a baixa detecção pode ser explicada por ser um micro-organismo fastidioso.

A baixa ocorrência da doença de Glässer em javalis pode estar relacionada à ausência de cepas virulentas ou a presença de imunidade nos rebanhos. A resistência à infecção ou doença pode ser explicada pelo longo período em que os filhotes permanecem com as mães, mantendo-os num ambiente favorável, pouco propício a aquisição de doenças como a causada pelo *H. parasuis*. Outra possível explicação seria a resistência natural à doença, embora os animais possam ser portadores (OLVERA et al., 2007; REINER et al., 2010). A identificação de *H. parasuis* no trato respiratório superior dos javalis demonstra similaridade com a microbiota dos suínos domésticos, o que indica a possibilidade de que possam atuar como fonte de infecção (OLVERA et al., 2007).

2.3. OUTROS AGENTES ENVOLVIDOS EM PNEUMONIA EM SUÍNOS E JAVALIS

2.3.1. *Streptococcus suis*

Dentre as bactérias Gram-positivas relacionadas com processos patológicos no pulmão dos suínos, destaca-se o *S. suis*, um patógeno encontrado naturalmente no trato respiratório superior e nas tonsilas. O patógeno é de distribuição mundial e pode desencadear

septicemia, meningite, artrite, endocardite e pneumonia, além de ter importância zoonótica (CHABOT-ROYA et al., 2006; HIGGINS & GOTTSCHALK, 2006).

S. suis são cocos Gram-positivos e são conhecidos, até o momento, 35 diferentes sorotipos, sendo o sorotipo 2 o mais comum em suínos (HIGGINS & GOTTSCHALK, 2006; BAUMS et al., 2007). Em um estudo na China, com diferentes tecidos de suínos, verificou-se que o sorotipo mais frequente foi o 2 seguido do 3. Nos casos de pneumonias, o sorotipo 3 prevaleceu (WEI et al., 2009).

A introdução de animais portadores sadios em rebanhos suínos não infectados desempenha papel importante na transmissão da infecção, pois usualmente resulta em doença. As principais rotas de transmissão são por via respiratória e soluções de continuidade. Os animais são mais afetados entre 5 e 10 semanas de idade e a pneumonia é a manifestação menos comum da doença. O diagnóstico é complexo e a sintomatologia inclui diferentes níveis de dispneia, cianose e emagrecimento ou morte súbita. Nos casos de envolvimento pulmonar, a lesão mais evidente é broncopneumonia supurativa (HIGGINS & GOTTSCHALK, 2006).

Em javalis selvagens, na Espanha, não foram identificados animais soropositivos (VICENTE et al., 2002). Na Alemanha, Baums et al. (2007) isolou 92% de *S. suis* de tonsilas de javalis e foram identificados 22 diferentes genótipos. Ainda, compararam genes envolvidos com virulência nos isolados de javalis e suínos portadores sadios e detectaram genes relacionados à virulência muito mais em suínos do que em javalis. Esta variação pode estar relacionada à seleção de cepas altamente virulentas devido à intensificação da produção de suínos.

2.3.2. *Mycoplasma hyorhinis*

Mycoplasma (M.) hyorhinis é parte da microbiota normal do trato respiratório superior dos suínos e, em algumas condições, pode causar doença sistêmica. A maioria das infecções são sub-clínicas, limitadas ao trato respiratório superior e raramente resultam em pneumonia. Quando ocorrem, os quadros de pneumonia são leves e afetam uma pequena porcentagem dos animais (ROVIRA et al., 2010).

Pouco se conhece sobre a epidemiologia do agente nas granjas de suínos. Os leitões infectam-se de fêmeas e animais mais velhos e muitos deles não desenvolvem doença. *M. hyorhinis* já foi isolado do trato respiratório de suínos saudáveis e doentes, entretanto, as

maiores taxas de isolamento foram encontradas em animais doentes (THACKER, 2006; ROVIRA et al., 2010).

A infecção experimental resulta em infecção sub-clínica, entretanto, quando se torna sistêmico pode causar doença severa. Animais de 3 a 10 semanas de idade são acometidos e pode ocorrer pleurite, pericardite, peritonite, artrite e otite. A sintomatologia depende da serosa afetada e inclui febre, dispneia, inchaço em articulações, laminite e relutância em se mover. Fatores do patógeno, ambiente e hospedeiro afetam a dinâmica de desenvolvimento da lesão (THACKER, 2006, ROVIRA et al., 2010).

Em javalis, não foram encontradas referências sobre a infecção com esse agente.

2.4.VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA

A influenza suína é uma doença respiratória aguda que cursa com broncopneumonia intersticial. Os suínos são hospedeiros naturais do Virus Influenza (VIS) tipo A e desenvolvem uma doença similar à humana. É uma infecção auto-limitante, de alta morbidade e baixa mortalidade (HOWDEN et al., 2009; LANGE et al., 2009; LOVING et al., 2010).

Os VIS pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero *influenzavirus*, e são caracterizados por serem pleomórficos, envelopados e por possuírem genoma RNA com sentido negativo, composto por oito segmentos. Os subtipos de Influenza A são classificados com base nas glicoproteínas de superfície como a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Atualmente, 16 diferentes tipos de HA e nove de NA são descritos. A HA é responsável pela adesão e penetração do vírus na célula do hospedeiro e a NA pela liberação do vírus da célula infectada e disseminação para outras células do trato respiratório. O vírus contém ainda, uma proteína da matriz (M2) com importância na codificação do vírus e outra, (M1), que é estrutural, responsável pelo brotamento viral (OLSEN et al., 2006; FLORES et al., 2007; CUNHA, 2010).

O suíno possui receptores distintos nas células epiteliais do trato respiratório, podendo se infectar tanto com vírus de origem de mamíferos como aviária. Esta característica faz com que o suíno possa se infectar com subtipos diferentes, muitas vezes concomitantes, podendo levar à substituição de nucleotídeos, de um segmento inteiro e até mesmo originar novos vírus recombinantes (OLSEN et al., 2006; FLORES et al., 2007; VINCENT et al., 2009).

Em suínos, a doença é considerada endêmica e os animais são portadores principalmente dos subtipos A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2. No Brasil, os dados sorológicos

indicaram a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 (2,2%) e H3N2 (16,7%) (BRENTANO et al., 2002) e quatro anos após, outro estudo determinou a incidência de anticorpos contra o subtipo H1N1 (85,29%) e H3N2 (85,29%) (MANCINI et al., 2006). O uso da transcriptase reversa PCR (RT-PCR) para a detecção do VIS a partir de amostras de secreção nasal de suínos também revelou a presença de material genético viral (SCHAEFER et al., 2008). Outro estudo brasileiro, analisando soros de suínos, relatou que 46% das granjas eram positivas, com 20% dos animais apresentando anticorpos para o subtipo H3N2 (CARON et al., 2010). Recentemente, Schaefer et al. (2011) relataram a presença do vírus pandêmico A/H1N1 em suínos. Ciacci-Zanella et al. (2011) ao avaliarem soros coletados de suínos no Brasil no período anterior a 2009 e após essa data demonstraram que anticorpos contra o vírus H1N1 pandêmico não foram detectados antes de 2009 no país.

A transmissão ocorre por contato direto, aerossóis a partir de tosse e espirros, fômites e introdução de animais portadores no rebanho. A infecção, sintomatologia, replicação viral e mudanças patológicas estão restritas ao sistema respiratório, e, talvez, ao trato digestório (OLSEN et al., 2006; FLORES et al., 2007; VINCENT et al., 2009; CUNHA, 2010).

Leitões neonatos e desmamados são suscetíveis à infecção, que pode ocorrer com maior gravidade que nos animais mais velhos (VINCENT et al., 2009; LOVING et al., 2010). A imunidade materna persiste por dois a quatro meses, e neste período, os leitões podem se infectar, mas a sintomatologia e taxa de excreção são inversamente proporcionais ao nível de anticorpos. Após este período, os suínos podem se infectar e desenvolver a doença (FLORES et al., 2007).

A doença é caracterizada por um início abrupto e curso curto. O período de incubação é de aproximadamente dois dias e no período inicial da doença as secreções apresentam alta concentração de vírus. Lange et al. (2009) demonstraram que animais sem imunidade, em contato com inoculados, desenvolveram sinais clínicos após dois a três dias. Após sete dias da infecção, dificilmente o vírus pode ser isolado dos pulmões ou outros tecidos do trato respiratório e isto coincide com a recuperação clínica que tende a ser rápida, entre quatro a sete dias, mas os sinais da doença podem persistir no rebanho por diversas semanas (OLSEN et al., 2006; FLORES et al., 2007; HOWDEN et al., 2009; CUNHA, 2010).

A replicação viral ocorre em células epiteliais da mucosa nasal, tonsilas, traqueia, pulmões e linfonodos traqueais. Os suínos desenvolvem quadros de pneumonia semelhantes aos humanos (LOVING et al., 2010) com tosse não produtiva, seca, profunda e com esforço abdominal, febre, baixa no consumo alimentar, aparecimento súbito de descarga nasal, espirro, conjuntivite suave, depressão e leve desidratação. A tosse, quando progressiva, sugere

envolvimento de bactérias secundárias e pode evoluir para o aparecimento de dispneia (LÓPEZ, 2006; OLSEN et al., 2006; FLORES et al., 2007; HOWDEN et al., 2009; LANGE et al., 2009). A partir da redução dos sinais clínicos no plantel podem desaparecer os sintomas ou ocorrer um agravamento, pela emergência de infecções secundárias por agentes oportunistas (como *P. multocida* e *H. parasuis*).

As lesões macroscópicas caracterizam-se por consolidação principalmente crânio-ventrais abrangendo em média de 10 a 30% do pulmão (VINCENT et al., 2009; SCHAEFER et al., 2011). A lesão é de consolidação multifocal a coalescente nos lobos craniais e médios, firme, bem demarcadas e de coloração avermelhada. Olsen et al. (2006) e Howden et al. (2009) comentam ainda, ocorrência de leve edema interlobular nos lobos caudais e presença de exsudato purulento devido à infecção por patógenos secundários.

As lesões microscópicas consistem de bronquite e bronquiolite necrosante, infiltrado linfocítico peribronquiolar leve, pneumonia broncointersticial, necrose multifocal e acúmulo de neutrófilos no lúmen e células descamadas, podendo causar bronquiolite obliterante (LÓPEZ, 2006; HOWDEN et al., 2009; VINCENT et al., 2009; BROOKE et al., 2010; LOVING et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011). Outras lesões incluem mudanças no epitélio bronquiolar, arredondamento e degeneração do epitélio progredindo de metaplasia cubóide a escamosa e leve traqueíte crônica não específica (HOWDEN et al., 2009; LOVING et al., 2010).

Foi observada a marcação viral por imunistoquímica em células epiteliais necróticas descamadas em bronquíolos e restos necróticos no lúmen alveolar (VINCENT et al., 2009) e em células epiteliais de brônquios e bronquíolos (SCHAEFER et al., 2011).

Em javalis, a infecção normalmente é aguda e a detecção clínica é dificultada pelo curso curto da doença, o que diminui as chances da detecção viral. Com relação à prevalência da doença em populações selvagens, Vicente et al. (2002) identificaram 4% das amostras de soro positivas para o subtipo H1N1 e nenhuma para H3N2. Kaden et al. (2008) detectaram em javalis 3,9% de anticorpos contra H1N1, 1,5% contra H3N2 e ausência de anticorpos para o H1N2. Por RT-PCR não foram detectados positivos e por isolamento em ovos, 0,8% das amostras foram positivas. Recentemente, Roic et al. (2012) detectaram 9,7% de anticorpos para o VIS H1N1.

Parece que em javalis o H1N1 é predominante quando comparado ao H3N2. Entretanto, estudos de soroprevalência em populações de javalis selvagens indicam que os animais infectados com o vírus geralmente não determinam epidemia em javalis, nem são reservatórios de vírus de alto risco para suínos domésticos. No entanto, em criações semi-

intensivas ou confinadas de javalis o vírus pode se tornar endêmico e, eventualmente, constituir risco para populações de suínos domésticos (KADEN et al., 2008; RUIZ-FONS et al., 2008).

3. ARTIGO I

ESTUDO ETIOLÓGICO E PATOLÓGICO DE PNEUMONIAS BACTERIANAS EM JAVALIS CRIADOS DE FORMA CONFINADA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

RESUMO

As doenças respiratórias são muito comuns na produção intensiva de suínos, já em javalis são escassos os dados de prevalência, etiologia e apresentação clínico-patológica destas enfermidades. O objetivo do presente estudo foi determinar a etiologia e caracterizar as lesões macroscópicas e microscópicas de pneumonias identificadas ao abate em javalis criados de forma confinada. Foram avaliados 226 pulmões e coletados para análises laboratoriais (pesquisa bacteriológica, molecular e avaliação histológica) 121 pulmões com lesões de pneumonia. Nestes pulmões, as lesões predominantes foram consolidação crânio-ventral dos lobos craniais e médios (75,2%) na macroscopia e lesões crônicas cursando com hiperplasia linfóide (BALT) moderada (45,9%) na histologia. Houve associação significativa ($P < 0,05$) entre hiperplasia do BALT e *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*. O principal agente detectado foi o *M. hyopneumoniae* (58,6%) e foram encontradas 28 combinações entre patógenos. O *M. hyopneumoniae* mostrou associação estatística significativa ($P < 0,05$) com a presença de *M. hyorhinis* e com quadros de lesões subagudas e crônicas e broncopneumonia supurativa. A detecção de agentes secundários, como a *P. multocida* (9,1%) foi relativamente baixa. O estudo revelou que as pneumonias em javalis de criatório apresentaram lesões e patógenos associados similares aos encontrados em suínos domésticos ao abate.

Palavras-chave: *Sus scrofa*, abate, *M. hyopneumoniae*, consolidação pulmonar, BALT.

INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias estão entre as enfermidades mais prevalentes na suinocultura intensiva. Em suínos domésticos, o agente mais comum em pneumonias é o *M. hyopneumoniae*. Além deste, podem atuar como agentes primários, bactérias como *Actinobacillus pleuropneumoniae* e agentes virais como vírus da influenza (THACKER, 2006; REDONDO et al., 2009; HANSEN et al., 2010). Aos mesmos, se agregam agentes de infecção secundária (como *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*), agravando os quadros clínicos e patológicos (CIPRIAN et al., 1988; SANTOS et al., 2007; HANSEN et al., 2010). Em javalis selvagens existem raros registros de agentes etiológicos e descrições sorológicas e patológicas de infecções pulmonares (VICENTE et al., 2002; REINER et al., 2010; SIBILA et al., 2010). Na literatura pesquisada, não foram encontradas referências deste tipo de estudo em javalis de criatórios, com exceção do registro clínico de Ecco et al., (2009). Neste trabalho, foi relatada sintomatologia e achados patológicos semelhantes aos suínos quando a infecção principal foi causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Existem poucos relatos sobre a etiologia e lesões induzidas por diferentes agentes de pneumonias em javalis selvagens e de criatório, o que dificulta a definição sobre o seu papel na epidemiologia da doença nesta espécie e na transmissão de agentes infecciosos pulmonares para suínos. Em função do pouco conhecimento sobre a situação das doenças pulmonares em javalis, no presente trabalho foram pesquisados também agentes bacterianos encontrados em suínos domésticos. O objetivo do trabalho foi determinar a etiologia e caracterizar as lesões macroscópicas e histológicas encontradas no pulmão de javalis de criatórios no momento do abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 226 pulmões de javalis (*Sus scrofa*) em um matadouro-frigorífico com fiscalização do Sistema de Inspeção Federal (SIF) durante os meses de fevereiro a outubro de 2011 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e coletados aqueles que apresentavam lesões pulmonares. Foram realizadas quatro coletas de javalis de dois criatórios abatidos com média de 7 meses de idade e peso médio de 32 kg.

Coleta de material: O critério usado para seleção dos pulmões foi a presença de lesão de pneumonia com qualquer extensão. As amostras foram armazenadas em sacos

plásticos individuais, e mantidas sob refrigeração (4-8°C) por até 24hs após a coleta para avaliação etiológica e histológica nos laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Análise anatomopatológica: lesões de consolidações, nódulos e pleurites foram analisadas quanto à área total lesionada, distribuição e localização no pulmão em: crânio-ventral (consolidação nos lobos craniais, médios, intermediário e porção anterior dos caudais); dorso-caudal (lesão na região dorso-caudal dos lobos caudais) e disseminada (lesões distribuídas por todos os lobos pulmonares). Para a quantificação das lesões, foi utilizada a metodologia “IPP” (índice para pneumonia), descrita por Piffer & Brito (1991), onde a área de parênquima pulmonar lesionado foi quantificado em 0 a 4, sendo o grau 4, o mais grave com 76 a 100% de área de lesão. A graduação foi realizada em cada lobo pulmonar e posteriormente os valores foram calculados em uma planilha específica.

Análise histológica: foram coletados fragmentos de pulmão em área de transição do tecido afetado e sadio abrangendo brônquios e/ou bronquíolos, fixado em solução de formalina tamponada à 10% por 24 a 48 horas e processado de acordo com métodos convencionais para análise histológicas (PROPHET et al., 1992). Quando observados pólipos (em bronquíolos e/ou alvéolos) foi realizada a técnica de coloração de Tricrômio de Masson, conforme protocolo do fabricante (EasyPath Ref. EP11-20013) para diferenciar pólipos de colágeno e fibrina. Quando identificadas células gigantes foi realizada coloração de Ziehl-Neelsen para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (PROPHET et al., 1992). De acordo com a classificação descrita por Hansen et al. (2010), adaptada, as lesões histológicas foram classificadas em Agudas: quando os neutrófilos foram às células predominantes no infiltrado inflamatório, sem a presença de outro componente característico de infecção crônica; Subagudas: quando observado neutrófilo como infiltrado predominante na presença de hiperplasia de BALT discreta ou moderada; Crônicas: hiperplasia de BALT moderada ou acentuada, hiperplasia de epitélio de brônquios/bronquíolos, presença de pólipos, célula gigante e infiltrado composto por linfócitos e plasmócitos.

Análise bacteriológica: foram utilizadas as técnicas de rotina aplicáveis para isolamento de patógenos aeróbios e anaeróbios facultativos e caracterização bioquímica através da metodologia descrita por Barrow & Feltham (1993) e Quinn et al. (1994). A semeadura foi realizada através da impressão de área de corte em secção pulmonar com lesão, após cauterização da região externa (região parietal). As amostras foram semeadas em Ágar Sangue acrescido de 5% de sangue ovino e Ágar Mac Conkey e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, em aerobiose. Foi utilizada também uma placa de Ágar Sangue acrescido de estria de

Staphylococcus aureus como fonte de fator V, incubada em microaerofilia (10% de CO₂), a 37° C por 24 a 72 horas.

Análise molecular: o DNA de suabes bronquiais foi extraído utilizando *kit* comercial (QiAmp DNA minikit, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas conforme previamente descrito por Costa et al. (2004) para o gene 16S de *A. pleuropneumoniae* e Oliveira et al. (2001) para *H. parasuis*. As PCRs para o gene *apxIV A* 16S do *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* foram realizados de acordo com Otagiri et al. (2005) e Stakenborg et al. (2006), respectivamente. De cada gênero identificado foram selecionadas, aleatoriamente, amostras para a realização do sequenciamento da região amplificada pela PCR com o intuito de confirmar a identidade do agente. Isolados do gênero *Streptococcus* foram diferenciados pela técnica de PCR em *S. suis* sorotipo 2 e subunidade 16S (qualquer sorotipo de *S. suis* exceto o sorotipo 2), de acordo com Marois et al. (2004).

Análise estatística: Todas as análises foram efetuadas com o *software* “Statistical Analysis System” (SAS, 2005). Os percentuais de ocorrência de lesões histológicas e agentes bacterianos e a análise de associação entre eles foram obtidos com a utilização do procedimento FREQ. O teste Qui-Quadrado ou o teste exato de Fisher foram utilizados para verificar se as associações foram significativas ao nível de probabilidade de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Entre os 226 pulmões avaliados, 127 apresentavam consolidação sugestiva de broncopneumonia (56,2%) e 121 foram coletados para exames laboratoriais.

O escore médio de lesão calculado pelo método IPP foi de 13,6% de área total pulmonar afetada e os lobos mais lesionados foram o médio direito seguido do cranial direito. Entre os pulmões lesionados, foram observados 31 (25,6%) com lesões no estágio de resolução. Outras alterações observadas incluíram quatro (3,3%) pulmões com pleurite focal de intensidade leve e um pulmão (0,8%) com nódulo necro-hemorrágico recoberto por pleurite, do qual foi isolada *P. multocida*.

Na avaliação histopatológica, foi encontrada maior ocorrência de lesões crônicas (70,2%), seguidas das subagudas (12,4%) e agudas (9,1%). Pulmões sem alteração histológica totalizaram 8,3% (10/121), sendo que nestes as lesões macroscópicas apresentavam distribuição crânio-ventral. A distribuição das lesões macroscópicas e principais lesões histológicas estão descritas na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Nos pulmões avaliados, foram identificados seis patógenos bacterianos que estão comumente envolvidos também em pneumonias de suínos. A frequência de ocorrência de cada agente de acordo com a classificação histopatológica está descrita na Tabela 4. A ocorrência de lesões agudas, subagudas e crônicas foi associada significativamente com *M. hyopneumoniae* e com *A. pleuropneumoniae* (Tabela 4).

Foram encontradas 28 combinações diferentes de patógenos identificadas em 84 amostras (69,4%). O agente que mais frequentemente esteve presente nas combinações foi o *M. hyopneumoniae*. As mais comuns foram de *M. hyopneumoniae* + *A. pleuropneumoniae* (n=11, 13,1%), *M. hyopneumoniae* + *H. parasuis* + *M. hyorhinis* (n=9, 10,7%) e *M. hyopneumoniae* + *A. pleuropneumoniae* + *H. parasuis* (n=7, 8,3%). O *M. hyopneumoniae* participou de 72,7% das combinações e a associação entre este agente e os demais apresentou associação significativa apenas com o *M. hyorhinis* (P= 0,03).

Hiperplasia do BALT teve associação positiva com a presença de *M. hyopneumoniae* (P= 0,001) e *M. hyorhinis* (P= 0,048) e não foi encontrada associação significativa com os outros patógenos detectados (Tabela 3). A associação do *M. hyopneumoniae* foi significativa (P<0,05) para todos os níveis de hiperplasia (76,2%, 60,0% e 64% para os níveis leve, moderado e acentuado, respectivamente vs 36% sem hiperplasia do BALT). A associação do *M. hyorhinis* foi significativa (P<0,05) para os níveis leve (52,4%) e moderado (48,0%), mas não significativa (P>0,05) para o nível acentuado (36%).

Foi observada associação significativa da broncopneumonia somente com o *M. hyopneumoniae* (Tabela 3). Quando a gravidade da broncopneumonia foi considerada, a associação com o agente foi mais evidente em casos acentuados (75,0%; P= 0,053) e moderados (70,4%; P= 0,026) do que nos casos leves (64,7%; P= 0,061).

DISCUSSÃO

No presente trabalho, o principal agente etiológico de pneumonia encontrado nos javalis (*M. hyopneumoniae*, presente em 58,6% dos pulmões), havia sido registrado causando quadro clínico nesta espécie por Ecco et al. (2009). O exame de diagnóstico utilizado na detecção do agente (PCR) é baseado na amplificação do DNA alvo, independente do título bacteriano presente ou da viabilidade do agente. Em estudo que avaliou o período em que havia amplificação em teste de PCR realizados após infecção experimental de suínos com *M. hyopneumoniae*, obteve-se resultado positivo até 214 dias após a inoculação (PIETERS et al.,

2009). Isto demonstra a dificuldade para a interpretação do resultado deste tipo de exame, o que pode ser extrapolado para os PCR realizados para os demais patógenos investigados neste estudo.

O segundo agente em ordem de frequência foi o *H. parasuis* (49,6%). Nos suínos, o agente é um oportunista importante associado á patógenos virais ou bacterianos, ou em casos de imunodepressão, causando polisserosite ou septicemia. Não é considerado um agente importante na etiologia de quadros pneumônicos (SANTOS et al., 2007). Em javalis, os poucos trabalhos já publicados referem-se à pesquisa de portadores ou estudos sorológicos, e nos mesmos foi constatada uma baixa frequência, sendo sugerido um papel apenas como invasor secundário (OLVERA et al., 2007). Além disso, no presente estudo não foi realizada a classificação genotípica de *H. parasuis*, que tem sido utilizada para diferenciar amostras comensais de virulentas.

A. pleuropneumoniae estava presente em 48,8% dos pulmões. Apesar da amplificação observada na PCR, em todos os casos este agente e o *H. parasuis* foram identificados em animais que não apresentaram, nos exames anátomo e histológicos, lesões sugestivas da infecção por estes agentes (aderências, pleurites e nódulos necro-hemorrágicos). Dessa forma, não foi possível definir a participação destes agentes nos quadros de lesão em análise. Além disso, o *A. pleuropneumoniae* foi detectado com frequência muito parecida entre as diferentes classificações histopatológicas (aguda, subaguda e crônica), o que reforça a suspeita de que a sua detecção não esteve associada com a etiologia das lesões. Sendo assim, o papel do *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* em pneumonias de javalis precisa ser melhor investigado.

M. hyorhinis estava presente em 41,3% dos casos e apresentou associação significativa com *M. hyopneumoniae* (P= 0,03), o que corrobora o observado por Palzer et al. (2008) em suínos. Entretanto, não se conhece a importância clínico-patológica desta associação, pois o *M. hyorhinis* é um comensal do trato respiratório de suínos e sua detecção no pulmão, por PCR, não define seu papel como causador das lesões de pneumonia eventualmente encontradas (ROVIRA et al., 2010). Na infecção com o *M. hyorhinis*, foi encontrada também hiperplasia do BALT em 13 casos da infecção em que não havia simultaneamente infecção com o *M. hyopneumoniae*. Este tipo de hiperplasia linfóide já havia sido registrado anteriormente em suínos infectados experimentalmente com o *M. hyorhinis* (LIN et al., 2006). Como nestes 13 pulmões com hiperplasia do BALT e com detecção do *M. hyorhinis*, o *M. hyopneumoniae* (agente que usualmente provoca este tipo de lesão) não estava presente, serão necessários novos estudos para esclarecer se o *M. hyorhinis*

é capaz de causar este tipo de lesão. No nosso trabalho, a hiperplasia do BALT foi a principal lesão (79,3%) em amostras positivas para *M. hyopneumoniae*. A associação com este agente se deve ao efeito mitogênico, que resulta em hiperplasia linfóide peribronquial, peribronquiolar e perivascular (PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009).

A baixa detecção de *P. multocida* (9,1%) pode estar relacionada com a ausência de cepas patogênicas circulantes nas populações de javalis ou uma dificuldade relacionada com a bactéria para atuar como patógeno secundário nesta espécie, em oposição ao que tem sido descrito em suínos (CIPRIAN et al., 1988). A ocorrência de *S. suis* em pneumonias de javalis foi similar ao que tem sido relatado em suínos, com ocorrência variando de 6 a 18% (HANSEN et al., 2010; FABLET et al., 2011). Se mantivesse esse padrão similar ao observado em suínos, seu papel na patogenia das pneumonias em javalis seria possivelmente como patógeno secundário.

No estudo atual, analisando as combinações de patógenos, evidenciou-se o papel do *M. hyopneumoniae* como agente principal das pneumonias de javalis. Os demais agentes identificados em conjunto com *M. hyopneumoniae* não tiveram lesões típicas presentes, como *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis*. Pelos dados do estudo atual, as combinações de patógenos em javalis (69,4%) foram menos comuns do que em suínos, em que associações de dois ou mais agentes pode ser observada em até 80% dos casos (MORES et al., 2011). Entretanto, não foi avaliada a participação de agentes virais o que poderia aumentar a ocorrência de associações de diferentes patógenos respiratórios em javalis, assim como ocorre em suínos (HANSEN et al., 2010).

O tipo de lesão mais comum foi a crônica e em fase de resolução e com a ausência de agentes viáveis na detecção bacteriológica, uma vez que não houve crescimento bacteriano em 80,1% das amostras. Ocorreu um número maior de resultados positivos na PCR, que poderiam refletir a presença de DNA residual de infecções anteriores.

Em javalis de criatórios, Ecco et al. (2009) descreveram um caso clínico de infecção por *M. hyopneumoniae*. Os autores registraram 18% de mortalidade, e destes, 70% apresentavam lesões pulmonares. Com relação à prevalência em suínos, Ostanello et al. (2007) encontraram valores de 59,6% e Fablet et al. (2011) 69,3%. Os valores foram similares ao que encontramos no trabalho atual em javalis (56,2%).

A distribuição predominante das lesões foi crânio-ventral afetando principalmente os lobos pulmonares médio e cranial direito, similar ao registrado por Morrison et al. (1985) e Sorensen et al. (1997) em suínos. As características foram de broncopneumonia, também similar ao que ocorre em suínos (MORRISON et al., 1985; LÓPEZ, 2006; HANSEN et al.,

2010). As consolidações eram de coloração vermelho-púrpura e, nos casos em resolução, acinzentadas, com consistência firme e bem demarcadas, similares às causadas pelo *M. hyopneumoniae* em suínos (SORENSEN et al., 1997; THACKER, 2006; SIBILA et al., 2007).

Os tipos e frequência das lesões histológicas encontradas nos javalis foram similares ao encontrado em suínos por Hansen et al. (2010). A predominância de lesões crônicas condiz com os achados de hiperplasia do BALT, presença do *M. hyopneumoniae* e lesões macroscópicas em processo cicatricial. Lesões causadas pelo *M. hyopneumoniae* em estágio de resolução no abate sugerem que a infecção tenha sido precoce, pois, em média, 85 dias após a infecção inicia sua cicatrização (SORENSEN et al., 1997). É provável que a associação do *M. hyopneumoniae* com casos subagudos e crônicos, também esteja relacionada ao caráter crônico da infecção. Achados semelhantes foram descritos em suínos por Morrison et al. (1985) e Fablet et al. (2011).

A associação entre broncopneumonia supurativa e *M. hyopneumoniae* reflete a resposta inflamatória induzida pelo agente, com broncopneumonia intersticial e infiltrado de células inflamatórias (REDONDO et al., 2009).

Outras lesões encontradas foram à presença de células gigantes. Esta lesão está geralmente relacionada no pulmão de suínos com patologias como pneumonia por aspiração ou corpos estranhos ou micobacteriose (LÓPEZ, 2006). No nosso estudo, a lesão estava presente em 4,1% das amostras. Não foram observados bacilos álcool-ácido resistentes, descartando a infecção por *Mycobacterium*, entretanto não foi possível definir a etiologia destes casos. A presença de pólipos (em alvéolos e/ou bronquíolos) foi registrada em 29,4% dos casos e o tipo predominante foi colágeno. Esta lesão foi descrita por Hansen et al. (2010) e tem importância desconhecida. A formação é decorrente de dano ao epitélio, sendo comum em lesões crônicas, como os que representaram a maioria dos casos do presente estudo.

Várias características das infecções encontradas nas pneumonias de javalis de criatório por ocasião do abate são similares a análises realizadas em pneumonias de suínos (tipos e frequência de agentes etiológicos bacterianos; associações entre *M. hyopneumoniae* e lesões histológicas; tipo e distribuição das lesões macroscópicas e tipo e classificação das lesões histológicas). Isto possivelmente possa ser explicado pela relação dos javalis como ancestrais dos suínos;

A alta prevalência de animais com pneumonia ao abate no atual estudo sugere que os javalis, mesmo sendo animais de origem selvagem, apresentam um aumento das infecções respiratórias ao serem criados de forma confinada, similar ao que ocorre com suínos

domésticos. A amostragem foi realizada em 17% dos animais abatidos no ano 2011 no Rio Grande do Sul (segundo dados do SIPS/RS), mas mesmo assim consistiu de uma amostragem numericamente pequena. Por isto, seriam necessários novos estudos para uma melhor definição de padrões de ocorrência de infecções pulmonares em javalis;

CONCLUSÕES

- Houve alta prevalência de pneumonias na avaliação de javalis ao abate;
- Foram encontradas similaridades nas características das pneumonias de javalis de criatório e suínos domésticos;
- O *M. hyopneumoniae* foi o agente principal das pneumonias dos javalis e o quadro patológico foi similar ao produzido pela bactéria em suínos domésticos;
- A detecção de patógenos secundários foi menor do que aquela usualmente registrada nas pneumonias de suínos e a forma de apresentação patológica do quadro foi predominantemente crônica.

Tabela 1. Localização das lesões macroscópicas identificadas em 121 pulmões de javalis com pneumonia, de acordo com a classificação histopatológica das áreas de consolidação

Lesão	Classificação histopatológica				Total n(%)
	Aguda n(%)	Subaguda n(%)	Crônica n(%)	Sem alteração ¹ n(%)	
Crânio-ventral	5 (5,5)	10 (11,0)	66 (72,5)	10 (11,0)	91 (75,2)
Dorso-caudal	3 (75,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	4 (3,3)
Disseminada	3 (22,6)	5 (19,2)	18 (69,2)	0 (0,0)	26 (21,5)
Total (n ^o de casos)	11 (9,1)	15 (12,4)	85 (70,2)	10 (8,3)	121 (100,0)

¹Pulmões que não apresentaram lesões histológicas;

Tabela 2. Descrição das principais lesões histológicas identificadas em 121 pulmões de javalis com pneumonia examinados, de acordo com a classificação histopatológica das áreas de consolidação

Lesões histológicas	Classificação histopatológica			
	Aguda (n=11) n(%)	Subaguda (n=15) n(%)	Crônica (n=85) n(%)	Total (n=121) n(%)
Hiperplasia do BALT¹				
0	6 (54,5)	1 (6,7)	8 (9,4)	15 (12,4)
+	4 (36,3)	4 (26,6)	13 (15,3)	21 (17,3)
++	1 (9,1)	10 (66,6)	39 (45,9)	50 (41,3)
+++	0 (0,0)	0 (0,0)	25 (29,4)	25 (20,7)
Broncopneumonia supurativa²				
0	3 (27,2)	3 (20)	32 (37,6)	38 (31,4)
+	2 (18,1)	5 (33,3)	27 (31,7)	34 (28,1)
++	3 (27,2)	5 (33,3)	19 (22,3)	27 (22,3)
+++	3 (27,2)	2 (13,3)	7 (8,2)	12 (9,9)
Bronquite	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (11,7)	10 (8,3)
Bronquiolite	3 (27,2)	2 (13,3)	27 (31,7)	32 (26,4)
Pólipos³				
Fibrina	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (4,7)	4 (3,3)
Colágeno	0 (0,0)	0 (0,0)	21 (24,7)	21 (17,3)
Hiperplasia de epitélio ⁴	0 (0,0)	4 (26,6)	9 (10,6)	13 (10,7)
Fibrina em alvéolo ⁵	1 (9,1)	3 (20)	6 (7,0)	10 (8,3)
Infiltrado em alvéolo				
Neutrófilo	2 (18,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,6)
Macrófago	1 (9,1)	1 (6,7)	17 (20)	19 (15,7)
Célula gigante (CG)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,3)	2 (1,6)
Misto	4 (36,3)	8 (53,3)	14 (16,5)	26 (21,5)
Macrófago + CG	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (3,5)	3 (2,5)

¹Hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios; ² Presença de neutrófilos na luz de brônquios e bronquíolos; ³Presença de pólipos em brônquios e alvéolos; ⁴Hiperplasia do epitélio de brônquios e bronquíolos; ⁵Exsudação de fibrina em alvéolo; 0 = ausente; + leve; ++ moderado; +++ acentuado; s/a: sem alteração histológica.

Tabela 3. Percentual da presença de agentes bacterianos detectados por exame bacteriológico ou PCR e sua associação com a hiperplasia do BALT e broncopneumonia supurativa

Agentes etiológicos	Hiperplasia do BALT ¹			Broncopneumonia supurativa		
	Ausência (n=25)	Presença (n=96)	Valor de P	Ausência (n=48)	Presença (n=73)	Valor de P
Cultura bacteriana						
<i>P. multocida</i>	4,0	10,4	0,3202	12,5	6,8	0,2902
<i>Streptococcus suis</i>						
Sorotipo 2	4,0	5,2	0,8042	2,08	6,8	0,2374
Outros sorotipos ²	0,0	5,2	0,2438	2,08	5,5	0,3585
<i>Streptococcus</i> sp.	4,0	3,1	0,8275	0,0	5,5	0,0991
PCR						
<i>M. hyopneumoniae</i>	36,0	64,6	0,0097	43,7	68,5	0,0068
<i>A. pleuropneumoniae</i>	60,0	45,8	0,2069	56,2	43,8	0,1814
<i>H. parasuis</i>	40,0	52,1	0,2818	45,8	52,0	0,5031
<i>M. hyorhinis</i>	24,0	45,8	0,0483	35,4	45,2	0,2847

¹Hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios; ²Classificação por PCR + (16S r RNA): *Streptococcus suis* qualquer sorotipo exceto o 2.

Tabela 4. Agentes bacterianos detectados por exame bacteriológico ou PCR e sua associação com a classificação histopatológica de lesões de consolidação em 121 pulmões

Agentes etiológicos	Agudo (n=11) n(%)	Subagudo (n=15) n(%)	Crônico (n=85) n(%)	Sem alteração ¹ (n=10) n(%)	Valor de P
Cultura bacteriana					
<i>P. multocida</i>	2 (18,1)	3 (20,0)	5 (5,9)	1 (10,0)	0,2281
<i>Streptococcus suis</i>					
Sorotipo 2	1 (9,1)	0 (0,0)	5 (5,9)	0 (0,0)	0,6027
Outros sorotipos ²	1 (9,1)	2 (13,3)	2 (2,3)	0 (0,0)	0,1719
<i>Streptococcus sp.</i>	0 (0,0)	1 (6,6)	3 (3,5)	0 (0,0)	0,7383
PCR					
<i>M. hyopneumoniae</i>	7 (63,6)	11 (73,3)	51 (60,0)	2 (20,0)	0,0533
<i>A. pleuropneumoniae</i>	4 (36,3)	8 (53,3)	38 (44,7)	9 (90,0)	0,0427
<i>H. parasuis</i>	5 (45,4)	8 (53,3)	44 (51,7)	3 (30,0)	0,6030
<i>M. hyorhinis</i>	5 (45,4)	9 (60,0)	35 (41,2)	1 (10,0)	0,0986

¹Pulmões que não apresentaram lesões histológicas; ²Classificação por PCR + (16S r RNA): *Streptococcus suis* qualquer sorotipo exceto o 2.

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Proc. 578376/2008-3). A Cooperativa Ouro do Sul por possibilitar a realização deste estudo. As alunas de pós-graduação Karine Takeuti e graduação Alana Motta e Carine Vier pelo auxílio nas coletas de materiais e execução das atividades de laboratório. Aos setores de Suínos e de Patologia da Faculdade de Veterinária (UFRGS), pelo auxílio laboratorial na execução do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROW, G.I., FELTHAM, R.K.A. **Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacterial**. Third Edition, Cambridge University Press. 331p., 1993.

CIPRIAN, A., PIJOAN, C., CRUZ, T., CAMACHO, J., TORTORA, J., COLMENARES, G., LÓPEZ-REVILLA, R., LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988.

COSTA, M.M., KLEIN, C.S., BALESTRIN, R.C., SCHRANK, A., PIFFER, I.A., SILVA, S. C., SCHRANK, I.S. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. **Current Microbiology**, v.48, n.3, p.189-195, 2004.

ECCO, R., LAZZARI, A.M., GUEDES, R.M.C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.461-468, 2009.

FABLET, C., MAROIS, C., DORENLOR, V., EONO, F., EVENO, E., JOLLY, J.P., LE DEVENDEC, L., KOBISCH, M., MADEC, F., ROSE, N. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. **Research in Veterinary Science**, 2011 (doi:10.1016/j.rvsc.2011.11.002).

HANSEN, M.S., PORS, S.E., JENSEN, H.E., BILLE-HANSEN, V., BISGAARD, M., FLACHS, E.M., NIELSEN, O.L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**. v.143, p.120-131, 2010.

LIN, J.H., CHEN, S.P., YEH, K.S., WENG, C.N. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.111-116, 2006.

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

MAROIS, C., BOUGEARD, D., GOTTSCHALK, M., KOBISCH, M. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and ½ in tonsils of live and dead pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3169-3175, 2004

- MORES, M.A.Z., KUCHIISHI, S.S., ASCOLI, K.R., MORÉS, N. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. **Anais...In: XV Congresso da ABRAVES**, 4 a 7 de outubro de 2011, Fortaleza, Brasil. Pasta E, CD ROM, 2011.
- MORRISON, R.B., PIJOAN, C., HILLEY, H.D., RAPP, V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.49, p.129-137, 1985.
- OLIVEIRA, S., GALINA, L., PIJOAN, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, n.6, p.495-501, 2001.
- OLVERA, M., CERDÀ-CUÉLLAR, G., MENTABERRE, E., CASAS-DIAZ, S., LAVIN, I., ARAGON, M.V. First isolation of *Haemophilus parasuis* and other NAD-dependent *Pasteurellaceae* of swine from European wild boars. Short communication. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.182-186, 2007.
- OSTANELLO, F., DOTTORI, M., GUSMARA, C., LEOTTI, G., SALA, V. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. **Journal of Veterinary Medicine A**, v.54, p.70-75, 2007.
- OTAGIRI, Y., ASAI, T., OKADA, M., UTO, T., YAZAWA, S., HIRAI, H., SHIBATA, I., SATO, S. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n.8, p.801-805, 2005.
- PALZER, A., RITZMANN, M., WOLF, G., HEINRITZI, K. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. **Veterinary Record**, v.162, p.267-271, 2008.
- PIETERS, M., PIJOAN, C., FANO, E., 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.
- PIFFER, I.A., BRITO, J.R.F. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. **Documentos**, Concórdia: EMBRAPA/CNPISA, n.23, 16p., 1991.
- PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 279p., 1992.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, p.237-242, 1994.
- REDONDO, E., MASOT, A.J., FERNÁNDEZ, A., GÁZQUEZ, A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.260-270, 2009.

REINER, R., FRESEN, C., BRONNERT, S., HAACK, I., WILLEMS, H. Prevalence of *Haemophilus parasuis* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. Short communication. **European Journal of Wild life Research**, v.56, p.815-818, 2010.

ROVIRA, A., CLAVIJO, M.J., OLIVEIRA, S. Infecção por *Mycoplasma hyorhinis* em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, supl.1, p.9-15, 2010.

SANTOS, J.L., BARCELLOS, D.E.S.N., MORÉS, N. **Pleuropneumonia**. In: Sobestiansky, Y., Barcellos, D.E.S.N. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone editorial. 2007. p.182-186, 2007.

SAS. SAS/STAT User's Guide, Release 6.12 SAS Institute INC, Cary, NC. 2005.

SIBILA, M., MENTABERRE, G., BOADELLA, M., HUERTA E., CASAS-DÍAZ, E., VICENTE, J., GORTÁZAR, C., MARCO, I., LAVÍN, S., SEGALÉS, J. Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.214-218, 2010.

SIBILA, M., NOFRARIÁS, M., LÓPEZ-SORIA, S., SEGALÉS, J., VALERO, O., ESPINAL, A., CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.97-107, 2007.

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 assays. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.23-34, 1997.

STAKENBORG, T., VICCA, J., BUTAYE, P., IMBERECHTS, H., PEETERS, J., DE KRUIF, A., HAESBROUCK, F., MAES, D. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. **Veterinary Research Communications**, v.30, n.3, p.239-247, 2006.

THACKER, E.L. **Mycoplasma diseases**. In: STRAW, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. Cap 42. p.701-718, 2006.

VICENTE, J., VIZCAÍNO, L.L., GORTÁZAR, C., CUBERO, M.J., GONZÁLEZ, M., MARTÍN-ATANCE, M. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from South-central Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.3, p. 649-652, 2002.

4. ARTIGO II

DETECÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A E ASSOCIAÇÃO COM PATÓGENOS BACTERIANOS EM JAVALIS CRIADOS DE FORMA CONFINADA NO BRASIL

RESUMO

A influenza é uma doença viral capaz de afetar diversos animais, incluindo suínos e javalis. No Brasil, circulam na população suína os subtipos cH1N1, pH1N1 e H3N2. Em javalis selvagens existem estudos em outros países, onde foram detectados os subtipos H1N1 e H3N2, não existindo relato da infecção por Influenza A em javalis selvagens ou criados de forma confinada no Brasil. O objetivo do trabalho foi verificar a presença do vírus da influenza em pneumonias em javalis confinados e a relação com os principais agentes infecciosos causadores de pneumonia em suínos. Foram coletados em abatedouro, 60 pulmões de javalis com lesão macroscópica sugestiva de pneumonia. A área pulmonar média afetada foi de 28,6% do parênquima. Foram observadas consolidações abrangendo a porção ventral dos lobos caudais em 13 (21,6%) pulmões. Onze dos 60 pulmões (18,3%) foram positivos para Influenza A por RT-PCR. Todas as 11 amostras foram positivas na qPCR cH1N1 (com carga viral variando de 4,58 a 6275 cópias/uL) e sete foram positivas para pH1N1 (com carga viral variando de 4,65 a 3863 cópias/uL). Três amostras foram sequenciadas e apresentaram homologia de 98 e 99% com o vírus pandêmico A/H1N1/2009. Nenhuma amostra apresentou título viral após a inoculação em ovos embrionados SPF. No exame bacteriológico duas das onze amostras (18,2%) foram positivas para *P. multocida*. As lesões histopatológicas principais foram broncopneumonia crônica difusa e pneumonia intersticial mononuclear leve além de hiperplasia do BALT. A IHQ foi negativa para VIS e positiva em todas as 11 amostras para *M. hyopneumoniae*. Este é o primeiro relato da infecção pelo vírus pH1N1 em javalis no Brasil e estes achados relatam que tanto o pH1N1 quanto *M. hyopneumoniae* e *P. multocida* circulam em javalis de criatórios no Brasil.

Palavras-chave: *Sus scrofa*, pneumonia, influenza, pH1N1, *M. hyopneumoniae*.

INTRODUÇÃO

A influenza suína é uma doença respiratória aguda causada pelo vírus da influenza (VIS) tipo A. O genoma do VIS é RNA composto por oito segmentos. Os subtipos de Influenza A são classificados com base nas glicoproteínas de superfície como a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Atualmente, 16 diferentes tipos de HA e nove de NA são descritos (MURPHY & WEBSTER, 1996; OLSEN et al., 2006; CUNHA, 2010). O suíno pode infectar-se com vírus humano e aviário devido aos distintos receptores nas células epiteliais do trato respiratório, o que predispõe ao aparecimento de novos vírus recombinantes (MURPHY & WEBSTER, 1996; OLSEN et al., 2006; VINCENT et al., 2009).

Em suínos, a doença é considerada endêmica e os animais são portadores principalmente dos subtipos H1N1, H3N2 e H1N2. No Brasil, já foram detectados os subtipos H1N1 clássico (cH1N1), H1N1 pandêmico (pH1N1) e H3N2 (BRENTANO et al., 2002; MANCINI et al., 2006; SCHAEFER et al., 2008; SCHAEFER et al., 2011). Em javalis, dados sorológicos de outros países indicam ausência de anticorpos para o subtipo viral H1N2, mas presença para os subtipos H3N2 e H1N1, sendo o último, o mais frequente (VICENTE et al., 2002; KADEN et al., 2008).

As principais lesões macroscópicas presentes em casos clínicos incluem consolidação, principalmente localizada nas áreas crânio-ventrais do pulmão e leve edema interlobular nos lobos caudais. Na histopatologia observa-se pneumonia bronco-intersticial, bronquite e bronquiolite necrosante e necrose multifocal (LÓPEZ, 2006; OLSEN et al., 2006; HOWDEN et al., 2009; VINCENT et al., 2009; LOVING et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011).

Os principais métodos de diagnóstico de Influenza A, tanto para a detecção do antígeno como para a detecção de anticorpos são: (a) isolamento viral em ovos embrionados, (b) isolamento viral em cultivo celular, (c) inibição da hemaglutinação - HI, (d) teste de ELISA, (e) transcrição reversa-reação da polimerase em cadeia - RT-PCR e (f) imunohistoquímica - IHQ (MURPHY & WEBSTER, 1996; VINCENT et al., 1997; HOFFMANN et al., 2001; CHAN et al., 2006; OLSEN et al., 2006; CIACCI-ZANELLA et al., 2010; LORUSSO et al., 2010). Devido às dificuldades encontradas para o isolamento viral, decorrente principalmente do momento correto para a coleta da amostra, já que a excreção viral ocorre somente por 5 a 7 dias durante a fase aguda da infecção (LANGE et al., 2009), são de grande valor as técnicas moleculares que contribuem para um diagnóstico mais rápido, específico e sensível.

As doenças respiratórias em suínos acontecem como resultado de uma interação entre patógenos bacterianos e virais, suscetibilidade animal, condições ambientais e falhas de manejo. Infecções por patógenos primários como aquelas causadas pelo *M. hyopneumoniae* e VIS, predispõem à infecções secundárias causadas geralmente por bactérias como *P. multocida*. Ao contrário do que se conhece em suínos domésticos, as doenças respiratórias em javalis (*Sus scrofa*) criados de forma confinada (em criatórios) são pouco relatadas e estudadas no mundo. O objetivo do trabalho foi verificar o envolvimento do VIS em casos de pneumonias em javalis criados de forma confinada (criação intensiva) e a associação com agentes infecciosos como o *M. hyopneumoniae* e oportunistas como a *P. multocida* nos casos positivos para o VIS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem: foram coletados, em abatedouro do estado do Rio Grande do Sul, 60 pulmões de javalis de 2 criatórios com lesões de consolidação pulmonar na linha de inspeção. As amostras foram coletadas em 2011, a partir de animais provenientes de criações confinadas. As lesões macroscópicas foram classificadas quanto à localização e a área média afetada e quantificadas através da metodologia proposta por Madec & Kolbisch (1982).

Exame Patológico dos Pulmões: as amostras coletadas foram fixadas em formalina 10% para avaliação histopatológica. Os tecidos foram processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (LUNA, 1968).

Análise Imunohistoquímica (IHQ): os tecidos fixados em formalina, embebidos em parafina, foram seccionados e processados para IHQ. Foi utilizado o biotin-streptavidin-peroxidase kit (LSAB Kit + System – HRP, Dako), como anticorpo monoclonal anti nucleoproteína do vírus Influenza A (HB-65) (VINCENT et al., 1997) a anti-proteína lactato desidrogenase (p36) no caso de *M. hyopneumoniae* (ECCO et al., 2009) e 3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC) como cromógeno.

Bacteriologia: foram utilizadas as técnicas de rotina aplicáveis para isolamento de patógenos aeróbicos e anaeróbicos facultativos e caracterização bioquímica através da metodologia descrita por Barrow & Feltham (1993) e Quinn et al. (1994). Colônias com crescimento predominante (mínimo de 70% de colônias com características coloniais similares) foram submetidas à análise morfo-tintorial e bioquímica.

A semeadura foi realizada através da impressão de área de corte em secção pulmonar com lesão, após cauterização da região externa (região parietal). As amostras foram semeadas

em Base de Ágar sangue acrescido de 5% de sangue ovino, em aerobiose a 37°C por 24 a 48h e microaerofilia, na presença de estria de *Staphylococcus aureus*, á 37°C por até 72h. Também foi realizada cultura em meio seletivo Ágar Mac Conkey e incubadas a 37° C por 24 a 48 horas, em aerobiose.

Detecção Viral: o RNA viral foi extraído utilizando o kit MagMAX (Ambion) e transcrito para cDNA usando o SuperScript II RT Kit (Invitrogen) juntamente com o primer complementar para os 12 nucleotídeos conservados na porção 3'(Uni12: 5'-AGCAAAAGCAGG-3') (HOFFMANN et al., 2001). Após foi feita a amplificação do gene codificante da proteína da matrix (M) usando primers com as sequências 5'- CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG -3' e 5'- AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA -3' (FOUCHIER et al., 2000).

As amostras positivas por RT-PCR foram testadas por PCR quantitativo (qPCR) para os subtipos cH1N1 e pH1N1, utilizando os primers e sonda: cH1N1 – (5'- AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG -3', 5'- TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG -3', 5'- TGC AAA GAC ACT TTC CAG TCT CTG -3' e FAM- TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA –TAMRA) e pH1N1 (5'- TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA -3', 5'- GGG CAC GGT GAG CGT GAA CA -3' e FAM- CGC GCA GAG ACT GGA AAG TGT C –TAMRA) (SPACKMAN & SUAREZ, 2008; LORUSSO et al., 2010).

O isolamento viral (IV) foi realizado em ovos embrionados (OE) SPF de nove dias, por inoculação via cório-alantóide. Após incubação, o líquido cório-alantóide foi coletado e testado por hemaglutinação (HA) e RT-PCR (PALMER et al., 1975; FOUCHIER et al., 2000).

Sequenciamento: a região da proteína M foi amplificada usando pares de primers específicos para esta região: 5'- AGC AAA AGC AGG TAG ATA TT -3' e 5'- AGT AGA AAC AAG GTA GTT TTT -3' (CHAN, 2006). Os produtos de PCR foram purificados em gel, utilizando Big Dye Terminator (Qiagen) e as sequências de nucleotídeos foram determinadas usando o sequenciador AB-3130xl. As sequências consenso foram geradas utilizando o software v2.5 SeqScape (Applied Biosystems) e analisadas usando a ferramenta BLAST (NCBI).

RESULTADOS

Todos os 60 pulmões apresentavam macroscopicamente lesões sugestivas de pneumonia, evidenciada por consolidações crânio-ventrais nos lobos craniais e médios.

Lesões extensas atingindo a porção ventral dos lobos caudais foram observadas em 13 (21,6%) pulmões e pleurite extensa em um (1,6%). A área média de parênquima pulmonar afetado foi de 28,6%.

Detecção Viral: onze dos 60 pulmões (18,3%) foram positivos para o gene M do VIS por RT-PCR. As 11 amostras positivas no RT-PCR foram também positivas no qPCR para cH1N1 (clássico). A carga viral variou de 4,58 a 6275 cópias/uL. Quando testadas pela mesma técnica para o pH1N1 (pandêmico), sete amostras foram positivas e a carga viral variou de 4,65 a 3863 cópias/uL.

Nenhuma amostra apresentou título viral após a inoculação em OE. No teste de RT-PCR do líquido córion-alantóide os resultados também foram negativos.

Sequenciamento: três amostras foram sequenciadas, apresentando homologia de 98 e 99% com o vírus pandêmico A/H1N1/2009 conforme demonstrado na Tabela 1.

Exame Patológico dos Pulmões: as 11 amostras positivas por RT-PCR para VIS foram submetidas ao exame histopatológico e apresentaram principalmente broncopneumonia crônica difusa e pneumonia intersticial mononuclear leve além de hiperplasia do BALT de intensidade acentuada. Foi observado edema alveolar, exsudação celular mista em bronquíolos e alvéolos e espessamento dos septos alveolares por infiltração linfohistioplasmocitária.

Análise IHQ: a IHQ foi negativa para VIS e positiva em todas as 11 amostras para *M. hyopneumoniae* nos cílios, quando presentes, e no epitélio e exsudato de brônquios e bronquíolos.

Bacteriologia: no isolamento bacteriano foram detectadas nas 11 amostras positivas para VIS, duas amostras positivas para *P. multocida* (18,2%). Não foram detectados outros patógenos bacterianos usualmente associados com pneumonia em suínos ou javalis (como *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*, *S. suis*, *B. bronchiseptica* ou *A. suis*).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da infecção pelo vírus pH1N1 em javalis de criatórios no Brasil e não foi encontrado achado similar em outros países. Este mesmo subtipo viral foi recentemente identificado em suínos domésticos no Brasil (SCHAEFER et al., 2011) e clinicamente a doença tem se apresentado de forma endêmica neste país. A emergência deste subtipo também foi demonstrada através da avaliação sorológica em soros anteriores e posteriores a 2009, em que anticorpos contra o vírus pH1N1 foram detectados apenas após 2009 (CIACCI-ZANELLA et al., 2011). Em um estudo em javalis selvagens realizado na Europa, 18,3% dos animais apresentaram anticorpos para o VIS. Contudo, de um modo geral a ocorrência da infecção é baixa, em torno de 4% (VICENTE et al., 2002; KADEN et al., 2008), ao contrário dos suínos, onde os relatos chegam a 85% (MANCINI et al., 2006).

A negatividade de títulos virais confirmados pela ausência de amplificação no RT-PCR do líquido córion-alantóide, bem como a ausência de antígenos no tecido pela IHQ e baixa carga viral na qPCR indicaram a inexistência de partículas virais viáveis (KADEN et al., 2008; HOWDEN et al., 2009; CUNHA, 2010). A fase aguda da doença compreende 5 a 7 dias pós-infecção e o vírus pode ser detectado nos brônquios em maior quantidade antes do desenvolvimento das lesões (entre 48 a 72 horas após a infecção) (JANKE, 2000; HOWDEN et al., 2009; LANGE et al., 2009). Brooke et al. (2010), em inoculação experimental, observaram que os maiores picos de eliminação aconteceram 4-6 dias pós infecção e cessaram no 16º dia. Dificuldades na detecção de antígeno viral em javalis selvagens foram relatadas por Kaden et al. (2008), devido ao curto curso da infecção, o que diminui a probabilidade de sucesso na detecção e isolamento viral. As amostras foram coletadas de animais em idade de abate, muito além da fase em que a doença costuma ocorrer a campo. Isto poderia explicar a negatividade da detecção de vírus viável nas amostras pulmonares, mas com detecção positiva de RNA viral na prova de PCR.

Os resultados negativos para as quatro amostras na qPCR provavelmente estejam relacionados com a diferença de sensibilidade para os dois subtipos, já que a sensibilidade para pH1N1 é 10 vezes menor que para cH1N1, e as amostras negativas para o pH1N1 tiveram baixas cargas virais para cH1N1 variando entre 4,58 a 20,46 cópias/uL.

A associação do VIS e patógenos bacterianos primários como o *M. hyopneumoniae* tem sido relatada em suínos domésticos (HANSEN et al., 2010; MORES et al., 2011; DEBLANC et al., 2012). Mores et al. (2011) registraram associações de dois ou mais agentes em até 80% dos casos clínicos de pneumonias em suínos. A co-infecção por patógenos

bacterianos oportunistas geralmente acontece após casos de imunodepressão ou infecções por patógenos primários. No presente estudo, em todos os casos em que a *P. multocida* foi identificada estava associada com o VIS e *M. hyopneumoniae*. A *P. multocida* tem importância em pneumonias de suínos domésticos, aparecendo principalmente como agente secundário ao *M. hyopneumoniae* e, menos frequentemente, a outros agentes como o VIS (CIPRIAN et al., 1988; PIJOAN, 2006; HANSEN et al., 2010; MORES et al., 2011). Não foram encontrados relatos do envolvimento de *P. multocida* com doenças respiratórias em javalis.

A área pulmonar média afetada por pneumonia nos javalis foi de 28,6% do parênquima, muito similar ao observado em suínos domésticos infectados pelo VIS, onde a área média de tecido afetado variou de 10 a 30% do pulmão (VINCENT et al., 2009; SCHAEFER et al., 2011). O tipo, coloração e distribuição das lesões de consolidação observadas foram semelhantes ao descrito em suínos em casos de infecção com VIS e *M. hyopneumoniae*. Entretanto, não foi detectado edema interlobular nos lobos caudais, presente em alguns casos de infecção pelo VIS (OLSEN et al., 2006; HOWDEN et al., 2009).

A principal lesão histopatológica encontrada foi hiperplasia do BALT com gravidade acentuada. Esta é a principal lesão observada em infecções pelo *M. hyopneumoniae* devido seu efeito mitogênico em linfócitos (PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009). A infecção por *M. hyopneumoniae* foi confirmada pela intensa marcação na IHQ nos cílios, quando presentes, no epitélio de brônquios e bronquíolos e no exsudato mucocelular dos mesmos. A presença de broncopneumonia crônica difusa e pneumonia intersticial mononuclear leve também são consequência da infecção pelo *M. hyopneumoniae*, embora pneumonia broncointersticial já tenha sido descrita em infecções pelo VIS (SCHAEFER et al., 2011). Não foram observadas nos pulmões lesões histopatológicas características de quadros de infecção viral (bronquite e bronquiolite necrosante, necrose multifocal e bronquiolite obliterante) (HOWDEN et al., 2009; VINCENT et al., 2009; LOVING et al., 2010; SCHAEFER et al., 2011). A presença de diferentes tipos de infiltrado inflamatório em 8/11 pulmões lesionados não é uma característica de um agente específico, mas pode ser detectada em diferentes tipos de infecção, incluindo patógenos bacterianos como *M. hyopneumoniae* e *P. multocida*.

Baseado nos resultados obtidos, tanto o pH1N1 quanto *M. hyopneumoniae* e *P. multocida* circulam em javalis de criatórios no Brasil. Estes agentes bacterianos e virais são comuns em infecções de suínos domésticos e acarretam em perdas produtivas consideráveis, devido à característica de indução de infecções crônicas (PIJOAN, 2006; REDONDO et al.,

2009). Este é o primeiro relato da infecção de javalis de criatórios com o vírus pH1N1 no Brasil. Com a finalidade de determinar o real impacto da infecção pelo VIS nas populações de javalis criados de forma confinada, serão necessários maiores estudos, incluindo a determinação do papel das co-infecções com outros agentes respiratórios.

Tabela 1. Tipos de vírus Influenza A pH1N1 com a maior identidade de sequências de nucleotídeos com o vírus pH1N1 detectado neste estudo, conforme determinado por pesquisa BLAST no NCBI.

ID ¹	Gene	Pb ²	Identidade	Valor E	Designação viral	Subtipo	GenBank n° de acesso
11D	M	221	98%	0.0	A/Kenya/0066/2009/ (H1N1)	pH1N1	HQ214432.1
	M		98%	0.0	A/California/VRDL133/ 2009(H1N1)	pH1N1	CY066440.1
13D	M	224	99%	0.0	A/Kenya/0066/2009/ (H1N1)	pH1N1	HQ214432.1
	M		99%	0.0	A/California/VRDL133/ 2009(H1N1)	pH1N1	CY066440.1
14D	M	221	99%	0.0	A/Kenya/0066/2009/ (H1N1)	pH1N1	HQ214432.1
	M		99%	0.0	A/California/VRDL133/ 2009(H1N1)	pH1N1	CY066440.1

M= matriz, ¹Identificação da amostra; ²Número de pares de bases;

Tabela 2. Principais lesões histopatológicas, resultados de IHQ¹ e bacteriologia nas 11 amostras de pulmão positivas para o vírus da Influenza suína por RT-PCR.

Amostras	Histopatologia		IHQ		Bacteriologia
	BALT ²	Infiltrado ³	<i>M. hyopneumoniae</i>	VIS ⁴	<i>P. multocida</i>
8C	+++	s/a	+++	Neg	Neg
6D	+++	Misto	+++	Neg	Neg
7D	++	LHP ⁵	+++	Neg	Neg
8D	s/a	Mononuclear	+	Neg	Neg
11D	+++	s/a	+++	Neg	++
13D	+++	Misto	+++	Neg	++
14D	+++	s/a	+++	Neg	Neg
3F	+	Mononuclear	+++	Neg	Neg
6F	++	Mononuclear	+++	Neg	Neg
8F	++	Mononuclear	+++	Neg	Neg
16F	+	Misto	+++	Neg	Neg

¹Imunohistoquímica; ²Tecido linfóide associado aos brônquios; ³Tipo de infiltrado em nas vias aéreas; ⁴Vírus da influenza suína; ⁵Infiltrado Linfohistioplasmocitário, +:Leve, ++:Moderado, +++:Acentuado, Neg:Negativo, s/a:sem alteração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROW, G.I., FELTHAM, R.K.A. **Cowan & Steel's Manual for the identification of medical bacterial**. Third Edition, Cambridge University Press. 331p., 1993.

BRENTANO, L., CIACCI-ZANELLA, J.R., MORES, N., PIFFER, I.A. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Comunicado técnico**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, n.306, p.1-6, 2002.

BROOKE, S.M., NÚÑEZ, A., CHOUDHURY, B., MATROSOVICH, M., ESSEN, S.C., CLIFFORD, D., SLOMKA, M.J., KUNTZ-SIMON, G., GARCO, F., NASH, B., HANN, A., HEEGAAR, P.M.H., QUÉGUINER, S., CHIAPPONI, C., BUBLLOT, M., GARCIA, J.M., GARDNER, R., FONI, E., LOEFFEN, W., LARSEN, L., VAN REETH, K., BANK, J., IRVINE, R.M., BROWN, I.H. Replication, Pathogenesis and transmission of Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Non - Immune Pigs. **PLoS ONE**, v.5, n.2, e.9068, 2010.

CHAN, C., LIN, K., CHAN, Y., WANG, Y., CHI, Y., TU, H., SHIEH, H., LIU, W. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.136, p.38-43, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J.R., SCHAEFER, R., SCHIOCHET, M.F., SILVEIRA, S., CARON, L., PIOVEZAN, U., JULIANO, R. Current and retrospective serology study of influenza A viruses antibodies in Brazilian pig populations. **Anais...** In: 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Barcelona. v.1, p.261-261, 2011.

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

CIPRIAN, A., PIJOAN, C., CRUZ, T., CAMACHO, J., TORTORA, J., COLMENARES, G., LÓPEZ-REVILLA, R., LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988.

CUNHA, B.A. Swine Influenza (H1N1) Pneumonia: Clinical Considerations. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.24, p.203-228, 2010.

DEBLANC, C., GORIN, S., QUÉGUINER, S., GAUTIER-BOUCHARDON, A.V., FERRÉ, S., AMENNA, N., CARIOLET, R., SIMON, G. Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. **Veterinary Microbiology**, 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.12.027

ECCO, R., LAZZARI, A.M., GUEDES, R.M.C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.461-468, 2009.

FOUCHIER, R.A., BESTEBROER, T.M., HERFST, S., VAN DER KEMP, L., RIMMELZWAAN, G.F., OSTERHAUS, A.D. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.4096-4101, 2000.

HANSEN, M.S., PORS, S.E., JENSEN, H.E., BILLE-HANSEN, V., BISGAARD, M., FLACHS, E.M., NIELSEN, O.L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p.120-131, 2010.

HOFFMANN, E., STECH, J., GUAN, Y., WEBSTER, R.G., PEREZ, D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2275-2289, 2001.

HOWDEN, K.J., BROCKHOFF, E.J., CAYA, F.D., MCLEOD, L.J., LAVOIE, M., ING, J.D., BYSTROM, J.M., ALEXANDERSEN, S., PASICK, J.M., BERHANE, Y., MORRISON, M.E., KEENLISIDE, J.M., LAURENDEAU, S., ROHONCZY, E.B. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1153-1161, 2009.

JANKE, S. Diagnosis of swine influenza. *Swine Health and Production*. v.8, n.2, p.79-83, 2000.

KADEN, V.A., LANGE E. A., STARICK, E.B., BRUER, W.C., KRAKOWSKI, W.C., KLOPRIES, M. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. **Veterinary Microbiology**, v.131, p.123-132, 2008.

LANGE, E., KALTHOFF, D., BLOHM, U., TEIFKE, J.P., BREITHAUPT, A., MARESCH, C., STARICK, E., FERREIDOUNI, S., HOFFMANN, B., METTENLEITER, T.C., BEER, M., VAHLENKAMP, T.W. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. Short communication. **Journal of General Virology**, v.90, p.2119-2123, 2009.

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

LORUSSO, A., FAABERG, K.S., KILLIAN, M.L., KOSTER, L., VINCENT, A.L. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples. **Journal of Virological Methods**, v.164, p.83-87, 2010.

LOVING, C.L., BROCKEMEIER, S.L., VINCENT, A.L., PALMER, M.V., SACCO, R.E., NICHOLSON, T.L. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. **Microbial pathogenesis**, v.49, p.237-245, 2010.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 3.ed. McGraw-Hill, New York, 1968.

MADEC, F., KOLBISCH, M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. **Journées Rech Porcine**, v.14, p. 405-412, 1982.

- MANCINI, D.A.P., CUNHA, E.M.S., MENDONÇA, R.M.Z., DIAS, A.L.F., CASTRO, A.F., PINTO, J.R., MENDONÇA, R.Z. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. **Virus Reviews and Research**. v.11, p.39-43, 2006.
- MORES, M.A.Z., KUCHIISHI, S.S., ASCOLI, K.R., MORÉS, N. Etiologia de problemas respiratórios em suínos enviados ao CEDISA para diagnóstico no ano de 2010. **Anais...In: XV Congresso da ABRAVES**, 4 a 7 de outubro de 2011, Fortaleza, Brasil. Pasta E, CD ROM, 2011.
- MURPHY, B.R., WEBSTER, R.G. **Orthomyxoviruses**. In: Fields, N.B. et al. **Virology**. 3.ed. Lippincott-Raven: Philadelphia, PA. 1996. p.1397-1445,1996.
- OLSEN, C.W., BROWN, I.H., EASTERDAY, B.C., Van REETH, K. **Swine Influenza**. In: Straw, B.E. et al. **Diseases of Swine**. 9.ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. Cap 28, p.469-482. 2006.
- PALMER, D.F., COLEMAN, M.T., DOWDLE, W.R., SCHILD, G.C. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series n.6 (U.S. Department of health, education and welfare, Washington, DC), p. 51-52, 1975.
- PIETERS, M., PIJOAN, C., FANO, E., 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.
- PIJOAN, C. **Pneumonic Pasteurellosis**. In: Straw, B.E. et al. **Diseases of Swine**. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. cap43, p.719-726. 2006.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, p.237-242, 1994.
- REDONDO, E., MASOT, A.J., FERNÂNDEZ, A., GÁZQUEZ, A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.260-270, 2009.
- SCHAEFER, R., TREVISOL, I.M., PALUDO, E. Avaliação da presença do vírus influenza em suínos no Sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, p.1-18, 2008.
- SCHAEFER, R., ZANELLA, J.R.C., BRENTANO, L., VINCENT, A.L., RITTERBUSCH, G.A., SILVEIRA, S., CARON, L., MORES, N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.9, p.761-767, 2011.
- SPACKMAN, E., SUAREZ, D.L. Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. **Methods in Molecular Biology**. v.436, p.19-26, 2008.
- VICENTE, J., VIZCAÍNO, L.L., GORTÁZAR, C., CUBERO, M.J., GONZÁLEZ, M., MARTÍN-ATANCE, M. Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in European

Wild Boars from Southcentral Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.3, p.649-652, 2002.

VINCENT, A.L., LAGER, K.M., FAABERG, K.S., HARLAND, M., ZANELLA, E.L., CIACCI-ZANELLA, J.R., KEHRLI JR, M.E., JANKE, B.H., KLIMOV, A. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v.4, n.2, p.53-60, 2009.

VINCENT, L.L., JANKE, B.H., PAUL, P.S., HALBUR, P.G. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffinembedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9. p. 191-195, 1997.

5. DISCUSSÃO GERAL

Informações sobre doenças em javalis de criatórios são escassas (ECCO et al., 2009). Em javalis, os estudos publicados são na maioria, investigações sorológicas em populações selvagens (VICENTE et al., 2002; MAROIS et al., 2006; REINER et al., 2010). Os artigos apresentados neste estudo (I e II) tratam da descrição patológica e etiológica de pneumonias em javalis de criatórios por ocasião do abate.

O artigo I objetivou o estudo patológico e etiológico (bacteriano) de casos de pneumonias e uma possível associação entre patógenos e lesões. O artigo II apresenta a pesquisa do vírus da influenza suína em casos de pneumonias e a relação com agentes bacterianos encontrados. Devido à carência de informações referentes a javalis e a relação genética desta espécie com suínos domésticos, as discussões foram baseadas no que foi relatado na literatura em suínos domésticos.

No artigo I, a prevalência de pneumonia foi de 56,2%, menor que o registrado em suínos (69,3%) (FABLET et al., 2011), mas que pode ser considerado alto devido ao índice de pneumonia (IPP). O IPP calculado para a população foi 1,06, o que segundo Sobestiansky et al. (2007), para o rebanho de suínos domésticos, é um índice de ocorrência, em que, possivelmente, há associação de agentes patogênicos com fatores de risco, acarretando na alta prevalência de animais afetados.

Tanto no artigo I quanto no II, o tipo, as características macroscópicas e padrão de distribuição das lesões observadas foi semelhante e característico das broncopneumonias presentes em suínos, demonstrando que as pneumonias em javalis de criatórios e de suínos eram similares (MORRISON et al., 1985; SORENSEN et al., 1997; KWON et al., 2002; MORÉS, 2006; THACKER, 2006; SIBILA et al., 2007; HANSEN et al., 2010). O predomínio de lesões crônicas na histologia e lesões macroscópicas em processo de cicatrização condiz com os achados de hiperplasia do BALT e presença do *M. hyopneumoniae*. Estas lesões causadas pelo *M. hyopneumoniae*, em estágio de resolução no abate, sugerem que a infecção foi precoce, pois em média 85 dias após a infecção inicia sua cicatrização (SORENSEN et al., 1997).

Nos dois estudos apresentados neste trabalho (artigo I e II), através da análise da distribuição e tipo de lesão macroscópica, achados patológicos e resultado dos exames etiológicos, foi possível determinar que o agente principal das pneumonias de javalis de criatórios foi o *M. hyopneumoniae*. No artigo I, a prevalência do agente detectado por PCR, foi 58,6% e foi o mais comumente observado nas combinações de patógenos encontradas. A

presença do agente apresentou associação com broncopneumonia supurativa, refletindo a resposta inflamatória induzida pelo agente, com broncopneumonia intersticial e infiltrado de células inflamatórias (REDONDO et al., 2009).

Neste mesmo estudo, a detecção de *M. hyorhinis*, *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* por PCR no pulmão não definiu o papel dos mesmos nos quadros lesionais em análise. Para *M. hyorhinis* e *H. parasuis*, ainda não foi definido a importância como agentes causadores de pneumonias em suínos (RAPP-GABRIELSON et al., 2006; ROVIRA et al., 2010) e é possível que, nos casos onde foram identificados, façam parte da microbiota pulmonar. A dificuldade em estabelecer um papel patogênico ao *M. hyorhinis*, *A. pleuropneumoniae* e *H. parasuis* se deve à dificuldade na interpretação do resultado do teste utilizado para a detecção (PCR), pois não é um teste quantitativo e detecta apenas a presença do agente, podendo identificar DNA residual de infecções antigas ou estado de portador.

No artigo II, a prevalência de pH1N1 foi de 18,3% e as amostras positivas para o VIS pH1N1 apresentaram marcação na IHQ para *M. hyopneumoniae*. A detecção do vírus pH1N1, mesmo que em baixas cargas virais e com partículas não integras devido aos resultados negativo no isolamento, demonstra que o vírus circulou nas populações de javalis bem como o *M. hyopneumoniae*. No ano de 2009 emergiu o subtipo viral pH1N1 em humanos e os primeiros registros da infecção de suínos detectada por sorologia no Brasil foram feitos a partir de 2009 (CIACCI-ZANELLA et al., 2011). Já a forma clínica da doença foi relatada a partir de janeiro de 2010 (SCHAEFER et al., 2011). Não existem relatos clínicos do problema, sorologia ou pesquisa sobre o agente em populações de javalis no Brasil, o que dificulta uma definição sobre a cronologia da infecção no nosso meio.

No artigo I, a lesão histológica predominante foi hiperplasia do BALT e teve associação positiva com a presença de *M. hyopneumoniae* (P= 0,001) e *M. hyorhinis* (P= 0,048). A associação com o *M. hyopneumoniae* se deve à imunomodulação e efeito mitogênico em linfócitos causado pelo agente, o que determina hiperplasia linfóide peribronquial, peribronquiolar e perivascular e predispõe a infecções bacterianas secundárias (OSTANELLO et al., 2007; PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009). No artigo II, as lesões principais observadas foram hiperplasia linfóide de intensidade acentuada, broncopneumonia crônica difusa e pneumonia intersticial mononuclear, estas, são consequência da infecção pelo *M. hyopneumoniae* (PIETERS et al., 2009; REDONDO et al., 2009), embora a pneumonia broncointersticial possa ser uma das lesões presentes nas infecções pelo VIS (SCHAEFER et al., 2011).

Nos artigos I e II a detecção da *P. multocida* manteve-se num padrão similar ao observado em suínos, mas seu papel nas pneumonias em javalis provavelmente fosse como patógeno secundário. A baixa detecção de *P. multocida* (9,1% a 18,2%) poderia estar relacionada com a ausência de cepas patogênicas circulantes nas populações de javalis. A ocorrência de *S. suis*, descrito no artigo I, foi similar ao que tem sido relatado em suínos (HANSEN et al., 2010; FABLET et al., 2011) e também pode ser considerado como um patógeno oportunista.

Nos dois trabalhos, amostras sem crescimento bacteriano poderiam estar relacionadas à cronicidade das lesões, o que sinalizaria para a possibilidade da ausência de agentes viáveis para detecção na bacteriologia por ocasião da coleta das amostras. Isto poderia ter relação com o tempo decorrido entre a infecção e os exames, com lesões já resolvidas ou em resolução, sem a presença do agente.

Outros agentes possivelmente relacionados com pneumonias e encontrados em javalis na histopatologia foram estruturas parasitárias adultas e ovos, mas com prevalência muito baixa (<2%). Na macroscopia, nos brônquios e bronquíolos foram buscadas estruturas parasitárias, mas não foram detectadas. Na literatura, as lesões de migração larval de *Ascaris suum* são descritas como presença de pontos vermelhos distribuídos no parênquima (LILJEGREN et al., 2003), o que não encontramos nos pulmões dos javalis do estudo atual. Entretanto, lesões de consolidação multifocal na região ventrocaudal dos lobos estavam presentes, o que segundo Stewart & Hoyt (2006) pode acontecer nas infecções por *Metastrongylus*. É possível que a intensificação da criação de javalis venha a diminuir drasticamente os problemas de infestações parasitárias na espécie, semelhante ao que foi observado na produção industrial de suínos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Diversas características das infecções encontradas nas pneumonias de javalis de criatório por ocasião do abate são similares às análises em suínos (tipos e frequência de agentes etiológicos bacterianos; associações entre *M. hyopneumoniae* e lesões histológicas; tipo e distribuição das lesões macroscópicas e tipo e classificação das lesões histológicas). Isto possivelmente possa ser explicado pela relação genética dos javalis como ancestrais dos suínos;
- A alta prevalência de animais com pneumonia ao abate no presente estudo sugere que os javalis, mesmo sendo animais de origem selvagem, apresentam um aumento das infecções respiratórias ao serem criados de forma confinada, similar ao que ocorre com suínos domésticos. Entretanto o estudo foi realizado numa amostragem limitada, sendo necessários novos estudos para uma melhor definição de padrões de ocorrência de infecções pulmonares em javalis;
- O *M. hyopneumoniae* foi o agente principal das pneumonias dos javalis e o quadro patológico foi compatível com o produzido pela bactéria em suínos domésticos;
- A detecção de patógenos bacterianos oportunistas foi menor do que aquela usualmente registrada nas pneumonias de suínos e as formas de apresentação patológica do quadro foram predominantemente crônicas;
- Este trabalho é o primeiro relato da infecção pelo vírus pH1N1 em javalis de criatórios no Brasil. Foi observado que o vírus estava circulando nas populações, mas a partir dos materiais coletados e resultados laboratoriais não foi possível definir as eventuais repercussões clínicas da infecção. Novos estudos em criatórios de javalis serviriam para uma obter uma visão mais adequada sobre as formas clínicas e patológicas da influenza nesta espécie;
- Foi constatado que a infecção por VIS nas populações de javalis em cativeiro já estava resolvida, pois não foram detectadas partículas virais íntegras, antígeno por IHQ e a carga viral detectada foi baixa nos exames efetuados;
- A detecção de *P. multocida* confirmou o envolvimento de patógenos oportunistas em associação com a infecção por *M. hyopneumoniae* e VIS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPECS, 2011. **Estatísticas** – Mercado interno de carne suína – Brasil – Produção. Acesso em Dez/2011. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado-interno/producao/Matrizes.pdf>. 2011.
- BAUMS, C.G., VERKÜHLEN, G.J., REHM, T., SILVA, L.M.G., BEYERBACH, M., POHLMAYER, K., VALENTIN-WEIGAND, P. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.3, p.711-717, 2007.
- BETHE, A., WIELER, L.H., SELBITZ, H.-J., EWERS, C. Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.97-105, 2009.
- BOSSÉ, J.T., JANSON, H., SHEEHAN, B.J., BEDDEK, A.J., RYCROFT, A.N., KROLL, J.S., LANGFORD, P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Review. **Microbes and Infection**, v.4, p.225-235, 2002.
- BRENTANO, L., CIACCI-ZANELLA, J.R., MORES, N., PIFFER, I.A. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Comunicado técnico**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, n.306, p.1-6, 2002.
- BROOKE, S.M., NÚÑEZ, A., CHOUDHURY, B., MATROSOVICH, M., ESSEN, S.C., CLIFFORD, D., SLOMKA, M.J., KUNTZ-SIMON, G., GARCO, F., NASH, B., HANN, A., HEEGAAR, P.M.H., QUÉGUINER, S., CHIAPPONI, C., BUBLLOT, M., GARCIA, J.M., GARDNER, R., FONI, E., LOEFFEN, W., LARSEN, L., VAN REETH, K., BANK, J., IRVINE, R.M., BROWN, I.H. Replication, Pathogenesis and transmission of Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Non - Immune Pigs. **PLoS ONE**, v.5, n.2, e.9068, 2010.
- CARON, L.F., JOINEAU, M.E.G., SANTIN, E., RICHARTZ, R.R.T.B., PATRICIO, M.A.C., SOCCOL, V.T. Seroprevalence of H3N2 influenza A virus in pigs from Paraná (South Brazil): Interference of the animal management and climatic conditions. **Virus Reviews and Research**, v.15, p.63-73. 2010.
- CASTILLA, K.S., GOBBI, D.D.S., MORENO, L.Z., PAIXÃO, R., COUTINHO, T.A., SANTOS, J.L., MORENO, A.M. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE. **Research in Veterinary Science**, 2011 (DOI:10.1016/j.rvsc.2011.04.006).
- CHABOT-ROYA, G., WILLSON, P., SEGURA, M., LACOUTURE, S., GOTTSCHALK, M. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. **Microbial pathogenesis**, v.41, p.21-32, 2006.
- CIACCI-ZANELLA, J.R., SCHAEFER, R., SCHIOCHET, M.F., SILVEIRA, S., CARON, L., PIOVEZAN, U., JULIANO, R. Current and retrospective serology study of influenza A viruses antibodies in Brazilian pig populations. **Anais**...In: 6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Barcelona. v.1, p.261-261, 2011.

CIPRIAN, A., PIJOAN, C., CRUZ, T., CAMACHO, J., TORTORA, J., COLMENARES, G., LÓPEZ-REVILLA, R., LA GARZA, M. *Mycoplasma hyopneumoniae* Increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988.

CUNHA, B.A. Swine Influenza (H1N1) Pneumonia: Clinical Considerations. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.24, p.203-228, 2010.

DAVIES, R.L., MacCORQUODALE, R., BAILLIE, S., CAFFREY, B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.59-67, 2003.

ECCO, R., LAZZARI, A.M., GUEDES, R.M.C. Pneumonia enzoótica em javalis (*Sus scrofa*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.461-468, 2009.

FABLET, C., MAROIS, C., DORENLOR, V., EONO, F., EVENO, E., JOLLY, J.P., LE DEVENDEC, L., KOBISCH, M., MADEC, F., ROSE, N. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. **Research in Veterinary Science**, 2011 (doi:10.1016/j.rvsc.2011.11.002).

FANO, E., PIJOAN, C., DEE, S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.69, p.223-228, 2005.

FLORES, E.F., LOVATO, L.T., SILVA, M.S., DEZENGRINI, R., DIEL, D.G. **Orthomyxoviridae**. In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: editora UFSM. 2007. Cap28. p.721-754, 2007.

FONSECA, C., NEVES, M.P., SILVA, V.G., SCHERER, S., AVILA CAMPELO, A.M.M. S., PINTO, L.L., CÁCERES FILHO, M.F.S. Status and Distribution of wild boar in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. (2011). Disponível em: http://www.redeprofauna.pr.gov.br/arquivos/File/artigos/Status_and_distribution_of_wild_boar_Brazil.pdf

GOTTSCHALK, M., TAYLOR, D.J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw, B.E. et al. *Diseases of Swine*. 9ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. cap 33. p.563-576, 2006.

HANSEN, M.S., PORS, S.E., JENSEN, H.E., BILLE-HANSEN, V., BISGAARD, M., FLACHS, E.M., NIELSEN, O.L. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v.143, p.120-131, 2010.

HERES, T.S. Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos. 63f. 2009. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

HIGGINS, R., GOTTSCHALK, M. **Streptococcal Diseases**. In: Straw, B.E. et al. *Diseases of Swine*. 9. ed. Australia: Blackewll Publishing Ltda. 2006. Cap47. p.769-783. 2006.

HOWDEN, K.J., BROCKHOFF, E.J., CAYA, F.D., MCLEOD, L.J., LAVOIE, M., ING, J.D., BYSTROM, J.M., ALEXANDERSEN, S., PASICK, J.M., BERHANE, Y., MORRISON, M.E., KEENLISIDE, J.M., LAURENDEAU, S., ROHONCZY, E.B. An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1153-1161, 2009.

KADEN, V.A., LANGE E. A., STARICK, E.B., BRUER, W.C., KRAKOWSKI, W.C., KLOPRIES, M. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. **Veterinary Microbiology**, v.131, p.123-132, 2008.

KICH, J.D., MORES, N., TRIQUES, N.J., NOGUEIRA, M.G., LOCATELLI, C., KLEIN, C.C., FELÍCIO, R.P. A *Pasteurella multocida* Tipo A atuaria como agente primário nos processos pneumônicos dos suínos? **Comunicado técnico**, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, n.469, p.1-7, 2007.

KWON, D., CHOI, C., CHAE, C. Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. **Veterinary Pathology**, v.39, p.584-587, 2002.

KUCHIISHI, S.S., KICH, J.D., RAMENZONI, M.L.F., SPRICIGO, D., KLEIN, C.S., FÁVERO, M.B.B., PIFFER, I.A. Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Brazil from 1993 to 2006. Short Communication. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.79-82, 2007.

LANGE, E., KALTHOFF, D., BLOHM, U., TEIFKE, J.P., BREITHAUPT, A., MARESCH, C., STARICK, E., FERREIDOUNI, S., HOFFMANN, B., METTENLEITER, T.C., BEER, M., VAHLENKAMP, T.W. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. Short communication. **Journal of General Virology**, v.90, p.2119-2123, 2009.

LILJEGREN, C.H., AALBAEK, B., NIELSEN, O.L., JENSEN, H.E. Some news aspects of the pathology, pathogenesis and aetiology of the disseminated lung lesion in slaughter pigs. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v.111, p.531-538, 2003.

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

LOVING, C.L., BROCKEMEIER, S.L., VINCENT, A.L., PALMER, M.V., SACCO, R.E., NICHOLSON, T.L. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions. **Microbial pathogenesis**, v.49, p.237-245, 2010.

MACEDO, N.R., OLIVEIRA, S.R., LAGE, A.P., SANTOS, J.L., ARAÚJO, M.R., GUEDES, R.M.C. ERIC-PCR genotyping of *Haemophilus parasuis* isolates from Brazilian pigs. Short Communication. **The Veterinary Journal**, v.188, p.362-364, 2011.

MAES, D. A. *pleuropneumoniae* infections in pigs: epidemiology, pathogenesis and control. **Proceedings**... In: Ceva University symposium A. *pleuropneumoniae* – from the microscope to the field, 4-6 September, 2011. Budapest, Hungary, p.5-19, 2011.

MANCINI, D.A.P., CUNHA, E.M.S., MENDONÇA, R.M.Z., DIAS, A.L.F., CASTRO, A.F., PINTO, J.R., MENDONÇA, R.Z. Evidence of swine respiratory infection by influenza viruses in Brazil. **Virus Reviews and Research**. v.11, p.39-43. 2006.

MAROIS, C., TOCQUEVILLE V., POTIER M.F., HARS, J., KOBISH M. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in French wild boar. **Proceeding...** In: 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark, v.2, p. 213, 2006.

MORES, M.A.Z. Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos. 91f. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MORRISON, R.B., PIJOAN, C., HILLEY, H.D., RAPP, V. Microorganisms Associated with Pneumonia in Slaughter Weight Swine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.49, p.129-137, 1985.

OLIVEIRA, S., PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Review. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.1-12, 2004.

OLSEN, C.W., BROWN, I.H., EASTERDAY, B.C., Van REETH, K. **Swine Influenza**. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. Cap 28, p.469-482. 2006.

OLVERA, M., CERDÀ-CUÉLLAR, G., MENTABERRE, E., CASAS-DIAZ, S., LAVIN, I., ARAGON, M.V. First isolation of *Haemophilus parasuis* and other NAD-dependent *Pasteurellaceae* of swine from European wild boars. Short communication. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.182-186, 2007.

OSTANELLO, F., DOTTORI, M., GUSMARA, C., LEOTTI, G., SALA, V. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. **Journal of Veterinary Medicine A**, v.54, p.70-75, 2007.

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

PIETERS, M., PIJOAN, C., FANO, E., 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.

PIJOAN, C. **Pneumonic Pasteurellosis**. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. cap43, p.719-726. 2006.

PORS, S.E., HANSEN, M.S., BISGAARD, M., JENSEN, H.E. Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.160-166, 2011.

RAPP-GABRIELSON, V. J., OLIVEIRA, S.R., PIJOAN, C. *Haemophilus parasuis*. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackwell Publishing Ltda. 2006. cap 40, p.681-690, 2006.

REDONDO, E., MASOT, A.J., FERNÁNDEZ, A., GÁZQUEZ, A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.260-270, 2009.

REINER, R., FRESEN, C., BRONNERT, S., HAACK, I., WILLEMS, H. Prevalence of *Haemophilus parasuis* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. Short communication. **European Journal of Wild life Research**, v.56, p.815-818, 2010.

ROIC, B., JEMERSIC, L., TERZIC, S., KEROS, T., BALATINEC, J., FLORIJCANCIC, T. Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boar (*Sus Scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. **Journal of Wildlife Diseases**, v.48, n.1, p.131-137, 2012.

ROSS, R.F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. **Animal Health Research Reviews**, v.7, n.1-2, p.13-29, 2007.

ROVIRA, A., CLAVIJO, M.J., OLIVEIRA, S. Infecção por *Mycoplasma hyorhinis* em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, supl.1, p.9-15, 2010.

RUIZ-FONS, F., SEGALÉS, J., GORTÁZAR, C. A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. **The Veterinary Journal**, v.176, p.158-169, 2008.

SANTOS, J.L., BARCELLOS, D.E.S.N., MORÉS, N. **Pleuropneumonia**. In: Sobestiansky, Y., Barcellos, D.E.S.N. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cãnone editorial. 2007. p.182-186, 2007.

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

SCHAEFER, R., CIACCI-ZANELLA, J.R., BRENTANO, L., VINCENT, A.L., RITTERBUSCH, G.A., SILVEIRA, S., CARON, L., MORES, N. Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.9, p.761-767, 2011.

SIBILA, M., MENTABERRE, G., BOADELLA, M., HUERTA, E., CASAS-DÍAZ, E., VICENTE, J., GORTÁZAR, C., MARCO, I., LAVÍN, S., SEGALÉS, J. Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. **Veterinary Microbiology**, v.44. p.214-218, 2010.

SIBILA, M., NOFRARIÁS, M., LÓPEZ-SORIA, S., SEGALÉS, J., VALERO, O., ESPINAL, A., CALSAMIGLIA, M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pig. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.97-107, 2007.

SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D.E.S.N., DRIEMEIER, D., MATOS, N.P.C. **Monitoramento de abate**. In: Sobestiansky, Y., Barcellos, D.E.S.N. Doenças dos Suínos. Goiânia: Cânone editorial. 2007. p.723-726, 2007.

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 assays. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.23-34, 1997.

STEWART, T.B., HOYT, P.G. **Internal parasites**. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackewll Publishing Ltda. 2006. Cap 55. p.901-914, 2006.

THACKER, E.L. **Mycoplasmal diseases**. In: Straw, B.E. et al. Diseases of Swine. 9. ed. Australia: Blackewll Publishing Ltda. 2006. Cap 42. p.701-718, 2006.

VENGUST, G., VALENCAK, Z., BIDOVEC A. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. **Journal of Veterinary Medical**. v.53, p.24-27, 2006.

VICENTE, J., VIZCAÍNO, L.L., GORTÁZAR, C., CUBERO, M.J., GONZÁLEZ, M., MARTÍN-ATANCE, M. Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in European Wild Boars from Southcentral Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.3, p.649-652, 2002.

VINCENT, A.L., LAGER, K.M., FAABERG, K.S., HARLAND, M., ZANELLA, E.L., CIACCI-ZANELLA, J.R., KEHRLI JR, M.E., JANKE, B.H., KLIMOV, A. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v.4, n.2, p.53-60, 2009.

WEI, Z., LI, R., ZHANG, A., HE, H., HUA, Y., XIA, J., CAI, X., CHEN, H., JIN, M. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. Short communication. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.196-201, 2009.