

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

**“A TOSSE EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES  
AMBIENTAIS E PATÓGENOS PRIMÁRIOS CAUSADORES DE PNEUMONIA”**

**JULIA HELENA MONTES**

**PORTO ALEGRE**

**2022**

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

“A TOSSE EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES  
AMBIENTAIS E PATÓGENOS PRIMÁRIOS CAUSADORES DE PNEUMONIA”

**Autora:** Julia Helena Montes.

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

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

PORTO ALEGRE

2022

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

#### CIP - Catalogação na Publicação

Montes, Julia Helena  
A TOSSE EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO  
COM FATORES AMBIENTAIS E PATÓGENOS PRIMÁRIOS  
CAUSADORES DE PNEUMONIA / Julia Helena Montes. --  
2022.  
65 f.  
Orientador: David Emilio Santos Neves de Barcellos.

Coorientadoras: Ana Paula Gonçalves Mellagi, Karine  
Ludwig Takeuti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Ambiente. 2. Contagem de tosse. 3. Mycoplasma  
hyopneumoniae. 4. Vírus da Influenza A. 5.  
Performance. I. Santos Neves de Barcellos, David  
Emilio, orient. II. Gonçalves Mellagi, Ana Paula,  
coorient. III. Ludwig Takeuti, Karine, coorient. IV.  
Título

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

JULIA HELENA MONTES

“A TOSSE EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES  
AMBIENTAIS E PATÓGENOS PRIMÁRIOS CAUSADORES DE PNEUMONIA”

Aprovado em 09 de março de 2022

APROVADO POR:

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim  
Membro da Comissão

Aprovado em 09 de março de 2022

*Ao meu pai Jacyr Montes (in memoriam), que me ensinou  
como se reerguer diante das adversidades da vida e se  
empenhou em meus estudos sempre em primeiro lugar. Aqui  
estão os resultados dos seus esforços.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por guiar meus passos e me acompanhar em todos os caminhos percorridos. “... Mas em tudo Deus tem um propósito”.

Ao meu pai, Jacyr Montes, que de onde estiver sei que estará orgulhoso por mais esta conquista. Seu amor sempre aquecerá meu coração e me lembrará o quanto sua força reflete em quem sou hoje.

À minha mãe, Maristela Rocha, mulher guerreira e mãe excepcional. Obrigada por acreditar em mim, não medir esforços para a realização dos meus sonhos e ser incansável incentivadora na busca da minha felicidade.

À toda minha família.

Aos amigos (e irmãos de coração) Mikaela Salles, Maria Eduarda Fortunato, Julia Duarte, Kebb Borstnez, Klayton Natan Moraes e Mayara Tamanini por segurarem minha mão nos momentos de dificuldade e também o copo nos momentos de felicidade.

À Elisa De Conti, parceira do dia-dia na execução do experimento, pelo jeito leve de viver e pelo imensurável aprendizado que compartilhamos. Assim como à Joana Magoga e Victoria Nunes por estarem presentes nos momentos decisivos do experimento.

À Victória Nunes, por se tornar muito mais que uma colega de mestrado e sim uma amiga no seu estilo “nem que morra”. Estou contigo até o fim!!

A toda equipe do Setor de Suínos pelos momentos de convivência e aprendizado. Em especial aos amigos Cristiane Hoegen, Guilherme Dos Santos Victória Komel. Vocês são exemplo de dedicação. Ao prof. Fernando Bortolozzo e prof. Rafael Ulguim por todo conhecimento, ensinamento e conselho compartilhado.

Ao meu orientador prof. David Barcellos e minhas coorientadoras Karine Takeuti e prof. Ana Paula Mellagi. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pelo auxílio e oportunidade em ter pessoas como vocês ao meu lado durante esses dois anos. Vocês são minha inspiração.

Ao CNPq e a Boehringer Ingelheim pelo auxílio financeiro.

A empresa Master por ter aberto as portas para realização do experimento.

Aos membros do PPGCV e da UFRGS.

## RESUMO

### A TOSSE EM SUÍNOS DE TERMINAÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES AMBIENTAIS E PATÓGENOS PRIMÁRIOS CAUSADORES DE PNEUMONIA

Autor: Julia Helena Montes

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

Coorientadoras: Prof. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Dra. Karine Ludwig Takeuti

Este estudo buscou verificar através da avaliação clínica longitudinal individual na fase de terminação e das lesões ao abate, a associação da tosse com as condições ambientais das instalações e com a presença de dois patógenos primários causadores de pneumonia em suínos (*Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* e vírus da Influenza A - IAV). Mil e duzentos animais de dois galpões de terminação da mesma propriedade foram utilizados. A origem dos animais, nutrição, manejo, estrutura e vacinação foram os mesmos para os galpões, exceto o manejo de cortinas. Em cada galpão, 5 pontos de avaliação foram definidos: um em cada extremidade e três distribuídos entre eles. Monitoramento ambiental e clínico foram realizados diariamente, manhã e tarde, em cada ponto a partir dos 110 aos 210 dias de idade (abate). Foram realizadas aferições da concentração de NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, umidade relativa do ar e temperatura de cada ponto/galpão. Após, a avaliação clínica individual era realizada através da contagem de tosse/baía. Amostras *in vivo* de 60 animais/galpão foram coletadas para detecção por PCR de *M. hyopneumoniae* e IAV. Ao abate, 970 pulmões foram macroscopicamente avaliados e 254 amostras de pulmões com diferentes severidades de lesões foram coletadas para avaliação histológica e detecção de ambos os agentes. Os animais foram individualmente pesados no início das avaliações e pré - abate (110 e 203 dias de idade). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software SAS® com nível de significância de 5%. Houve uma maior contagem de tosse no turno da manhã comparado ao turno da tarde ( $3,8 \pm 0,3$  vs.  $2,5 \pm 0,2$  tosses/avaliação/ponto;  $P < 0,01$ ). Assim como, os dois pontos de avaliação nas extremidades dos galpões ( $P < 0,01$ ) tiveram maior contagem. Foi observado um acréscimo na contagem de tosse com: decorrer das semanas ( $r = 0,70$ ;  $P < 0,01$ ), concentração de NH<sub>3</sub> ( $r = 0,50$ ;  $P < 0,01$ ), umidade relativa do ar ( $r = 0,18$ ;  $P < 0,01$ ) e concentração de CO<sub>2</sub> ( $r = 0,09$ ;  $P < 0,01$ ). Correlações negativas na contagem de tosse com a temperatura mínima ( $r = -0,17$ ;  $P < 0,01$ ) e

variação de temperatura ( $r = -0.06$ ;  $P = 0.02$ ) foram observadas. Não houve associação de tosse com lesões pulmonares (macro e microscópicas) e detecção de *M. hyopneumoniae* ao abate ( $P > 0,05$ ). Foi observado que pulmões com lesões microscópicas sugestivas de *M. hyopneumoniae* e/ou IAV tiveram maior chance ( $P < 0,01$ ) de apresentarem lesões macroscópicas mais severas do que pulmões sem lesões (OR = 3,7; 14,0 e 60,0 para *M. hyopneumoniae*, IAV e *M. hyopneumoniae* + IAV, respectivamente). Leitões que apresentaram  $\geq 6$  episódios de tosse (classe 4 e 5) durante as avaliações tiveram GPD significativamente menor ( $1,02 \pm 0,01$  e  $0,98 \pm 0,02$  kg/d, respectivamente) comparados a animais que não apresentaram tosse (Classe 0;  $1,09 \pm 0,01$  kg/d) ( $P < 0,01$ ). Em conclusão, a tosse possui comportamento diferente de acordo com a qualidade ambiental das instalações, que pode afetar e agravar a condição respiratória e piorar o desempenho dos animais.

**Palavras – chaves:** Ambiente. Contagem de tosse. *Mycoplasma hyopneumoniae*. Performance. Vírus da Influenza A.



## ABSTRACT

### *COUGHING IN FINISHING PIGS AND ITS ASSOCIATION WITH ENVIRONMENTAL FACTORS AND PRIMARY PATHOGENS CAUSING PNEUMONIA*

*Author: Julia Helena Montes*

*Advisor: Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos*

*Co-advisors: Prof. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi*

*Dra. Karine Ludwig Takeuti.*

Through an individual longitudinal clinical assessment on the finish stage and occurrence of lung lesions this study aimed to verify the association of cough with the environmental conditions of the facilities and the presence of two primary pathogens causing pneumonia in pigs (*M. hyopneumoniae* and Influenza A virus (IAV)). One thousand two hundred pigs from two finishing barns on the same farm were used. Animal origin, nutrition, stocking density, health management and management were the same for both units, except for the management of curtains. In each barn, 5 sampling points were defined: one at each extremity and three between them. Environmental and clinical monitoring were performed daily, morning and afternoon, at each point from 110 to 210 days of age (slaughter). Measurements of the concentration of NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, relative humidity, and temperature of each point/barn were made. After, the individual clinical examination was performed counting coughing per pen. Sixty pigs/barn were collected for PCR detection of *M. hyopneumoniae* and IAV, in vivo. At slaughter, 970 lungs were macroscopically evaluated and 254 lungs samples with different degrees of lesions severity were collected for histological evaluation and detection of both agents. Pigs were individually weighed at the beginning of the evaluations and at pre-slaughter (110 and 203 days of age). All data were analyzed using SAS® Software with a significance level of 5%. There was a higher coughing count in the morning shift compared to the afternoon shift ( $3.8 \pm 0.3$  vs.  $2.5 \pm 0.2$  coughs/assessment/point;  $P < 0.01$ ). Moreover, the two sampling points at the barns extremity had higher counts ( $P < 0.01$ ). Coughing count increased within: weeks of housing ( $r = 0.70$ ;  $P < 0.01$ ), NH<sub>3</sub> concentration ( $r = 0.50$ ;  $P < 0.01$ ), relative humidity ( $r = 0.18$ ;  $P < 0.01$ ), and CO<sub>2</sub> concentration ( $r = 0.09$ ;  $P < 0.01$ ). Negative correlation coefficient was observed with minimum temperature ( $r = -0.17$ ;  $P < 0.01$ ) and temperature variation ( $r = -0.06$ ;  $P = 0.02$ ). There was no association of cough with lung

lesions (macro and microscopic) and *M. hyopneumoniae* detection at slaughter ( $P > 0.05$ ). Lungs with microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and/or IAV had more chance ( $P < 0.01$ ) to have more severe lesions than lungs with no lesions (OR = 3.7; 14.0 and 60.0 for *M. hyopneumoniae*, IAV and *M. hyopneumoniae* + IAV, respectively). Piglets that had  $\geq 6$  episodes of coughing (class 4 and 5) during the assessments had significantly lower ADG ( $1.02 \pm 0.01$  and  $0.98 \pm 0.02$  kg/d, respectively) compared to pigs without a cough (Class 0;  $1.09 \pm 0.01$  kg/d) ( $P < 0.01$ ). In conclusion, coughing showed different patterns according to the environmental quality of the facilities, which could affect and worsen the pigs respiratory condition, impacting in their performance.

**Keywords:** Coughing count. Environment. Influenza A virus. *Mycoplasma hyopneumoniae*. Performance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Schematic overview of selected pens in each barn (A and B) and sampling points used in the trial (P1 to P5) .....	37
<b>Figura 2</b> – Trial timeline.....	37
<b>Figura 3</b> - Mean coughing count and NH <sub>3</sub> concentration according to the week assessments in each finishing barn.....	42
<b>Figura 4</b> - Average coughing count according to the point assessed (A) and average of coughing count in each assessment (shift) according to the study week and sampling point (B).....	45
<b>Figura 5</b> – Suggestive microscopic lesions percentage of <i>M. hyopneumoniae</i> and IAV according to lung lesion severity in the finishing pigs. ....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Environment condition according to the barn and shift and its interaction.....	44
<b>Tabela 2</b> - <i>M. hyopneumoniae</i> and IAV occurrence of microscopic lesions suggestive of both agents in finishing pigs according to the barn .....	47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1. Sistema Respiratório Suíno .....	15
2.1.1. Anatomia .....	15
2.1.2. Fisiologia .....	16
2.1.3. Mecanismos de defesa .....	17
2.2. Complexo Respiratório Suíno .....	19
2.2.1. Principais agentes envolvidos no CDRS .....	19
2.2.2. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	21
2.2.3. Vírus da Influenza A .....	25
2.3. Gerenciamento de doenças respiratórias e a Tosse .....	29
2.4. Relação Ambiente e Doenças Respiratórias .....	30
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>33</b>
1. Introduction .....	34
2. Material and methods .....	35
3. Results .....	41
4. Discussion .....	48
5. Conclusions .....	53
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias em suínos, conhecidas como Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS), representam grande preocupação na produção de suínos em todo o mundo (MERIALDI et al., 2012). O CDRS é caracterizado por uma combinação de fatores de risco ambientais e agentes infecciosos primários e secundários (SIBILA et al., 2009). As perdas econômicas em consequência deste complexo têm sido relatadas e são dependentes dos agentes envolvidos. No caso do vírus da Influenza A (IAV) estima-se uma perda financeira entre US\$ 10,23 e US\$ 3,23 por leitão produzido em sistema *wean-to-finish* nos E.U.A. (DONAVAN, 2005; HADEN et al. 2012). Enquanto que para *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* essas perdas variam dependendo da porcentagem de lesão no parênquima pulmonar, podendo chegar a US\$ 6,55 por leitão ao abate (FERRAZ et al., 2020). Além disso, o CDRS é uma das principais razões para o uso de antimicrobianos em suínos em crescimento e terminação (PESSOA et al., 2021), podendo favorecer o surgimento de cepas bacterianas resistentes e causar risco à saúde pública.

No Brasil, microrganismos como *M. hyopneumoniae*, IAV, *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* e Circovirus Suíno Tipo 2 (PCV2) atuam como agentes primários de pneumonias, podendo facilitar a infecção por agentes secundários, como: *Pasteurella (P.) multocida* e *Glaesserella (G.) parasuis* (WILSON et al., 2012). Pelo fato das doenças clínicas pelo PCV2 estarem sendo controladas pela vacinação e pelo *A. pleuropneumoniae* estar mais relacionado a problemas isolados em granjas endêmicas, os patógenos primários IAV e *M. hyopneumoniae* vêm se destacando por estarem amplamente distribuídos nos planteis brasileiros e causarem grande impacto na produção, principalmente nas fases de crescimento e terminação (SCHAEFER et al., 2011; MORÉS et al., 2015).

O impacto da ambiência no CDRS vêm sendo estudado, sendo que os feitos da ventilação, amônia, partículas suspensas no ar, temperatura, sazonalidade e níveis de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) já foram demonstrados (NI et al., 2008; MICHIELS et al., 2015; CHANTZIARAS et al., 2020; FRÉDERIC et al., 2021;). Sabe-se que cada um desses fatores possui um ou mais mecanismos capaz ou capazes de impactar e diminuir as defesas do aparelho respiratórios dos suínos. No caso da amônia há uma depressão da atividade ciliar e conseqüentemente redução do fluxo do muco respiratório (STOMBAUGH et al., 1969). Enquanto o CO<sub>2</sub> acaba sendo menos prejudicial à saúde respiratória, porém, é um indicativo da qualidade da ventilação nos galpões diretamente relacionado com outros gases

de efeitos deletérios a saúde respiratória animal (NI *et al.*, 2008). Independente da causa, a sintomatologia clínica principal do CDRS é a tosse, podendo ser uma excelente ferramenta para auxiliar no monitoramento sanitário dos animais (NATHUES *et al.*, 2012; LUEHRS *et al.*, 2017; RYT-HANSEN *et al.* 2019; PESSOA *et al.*,2021 ). Nathues *et al.* (2012), relatam que uma única avaliação quantitativa de tosse em suínos em terminação próximos ao abate pode ser usada para diagnosticar Pneumonia Enzoótica associada ao *M. hyopneumoniae*, enquanto RYT-HANSEN *et al.*, 2019, relatam seu uso da detecção de surtos de IAV.

Apenas o método de contagem pode ser um diagnóstico subjetivo para agentes infecciosos. No Brasil atualmente é comum a associação de tosse com doenças respiratórias, onde, a porcentagem de animais afetados em um galpão é utilizada para a tomada de decisão da utilização massal de antimicrobianos para o tratamento dos animais. Porém, outros fatores podem estar associados à presença de tosse, como a ambiência, o que combinado com a utilização de antimicrobianos sem a real necessidade pode favorecer o aparecimento de isolados resistentes aos antimicrobianos. Tais manejos ressaltam a importância do entendimento da tosse e dos fatores associados ao seu aparecimento. . Com base nisso, o objetivo deste estudo foi verificar a associação de tosse com as condições ambientais das instalações e a presença de dois patógenos primários causadores de pneumonia em suínos (*M. hyopneumoniae* e IAV) através de uma avaliação clínica longitudinal individual na terminação e ocorrência de lesões pulmonares, bem como, seu impacto no desempenho.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Sistema Respiratório Suíno**

#### **2.1.1. Anatomia**

O sistema respiratório pode ser dividido em trato respiratório superior (TRS) e trato respiratório inferior (TRI). A parte externa ao tórax, composta pela cavidade nasal, seios nasais, nasofaringe, laringe e traqueia compreende o TRS; enquanto o TRI consiste em brônquios, bronquíolos terminais e respiratórios, e alvéolos, região em que acontecem as trocas gasosas (KONING & ERICH, 2016).

A função mais conhecida do TRS é a condução do ar até os pulmões para que ocorra a troca gasosa. Porém, outras funções importantes estão relacionadas às estruturas que compõem essa divisão (ZIMMERMAN *et al.*, 2019). A cavidade nasal e as conchas nasais

(cornetos nasais) aquecem e umedecem o ar, além de realizar a filtração de corpos estranhos. Já a laringe protege a entrada para a traqueia, regulando a inspiração e expiração de ar, desempenhando também uma função essencial para a vocalização. A traqueia se divide em brônquios do tronco principal, os quais se subdividem até as divisões terminais, os alvéolos, o local principal das trocas gasosas (KONING & ERICH, 2016).

No suíno, emerge um brônquio traqueal separado antes da bifurcação da traqueia (carina) que ventila o lobo cranial direito do pulmão (KONING & ERICH, 2016). A carina posteriormente forma os brônquios principais direito e esquerdo que apresentam, por sua vez, ramificações brônquicas secundárias para os respectivos lobos pulmonares no lado direito e esquerdo (ZIMMERMAN *et al.*, 2019).

O pulmão é dividido em lado direito e esquerdo e em sete lobos: o lado direito é composto pelos lobos cranial, médio e caudal, e o lobo acessório, que é localizado na parte ventral do pulmão. Já, o lado esquerdo é composto apenas pelos lobos cranial, médio e caudal. Os lobos variam em tamanho sendo independentes, ou seja, cada lobo possui um bronquíolo e são separados por septos interlobulares sólidos, tendo ventilação colateral mínima (KONING & ERICH, 2016). Com isso, o exsudato dentro dos alvéolos, em casos de uma broncopneumonia, é frequentemente retido dentro dos lóbulos, dando aos pulmões uma linha acentuada de demarcação entre os lóbulos afetados e não afetados (ZIMMERMAN *et al.*, 2019).

### **2.1.2. Fisiologia**

A função principal do sistema respiratório é a troca gasosa, fornecendo oxigênio para manter o metabolismo tecidual e removendo o dióxido de carbono para o ambiente. Os processos envolvidos nessa troca são: a ventilação, a distribuição de gás dentro do pulmão, a difusão pela membrana alvéolo-capilar e o transporte de O<sub>2</sub> presente no sangue dos pulmões para os capilares teciduais e de CO<sub>2</sub> na direção oposta (LOWE *et al.*, 2020).

Basicamente a ventilação ocorre através da inspiração e expiração. Na inspiração, há a entrada de ar nos pulmões através da contração da musculatura do diafragma e dos músculos intercostais, deslocando o diafragma caudalmente e elevando as costelas (LOWE *et al.*, 2020). Esse movimento promove o aumento da caixa torácica e a redução da pressão interna em relação à externa, forçando o ar a entrar nos pulmões pela pressão negativa. Já na expiração, há o movimento inverso, ocorrendo o relaxamento da musculatura do diafragma e dos



músculos intercostais, resultando na diminuição da caixa torácica e aumento da pressão interna, forçando o ar sair pelos pulmões (LOWE *et al.*, 2020).

Dentro dos pulmões, o ar é distribuído pela árvore brônquica, chegando aos alvéolos para a troca gasosa. O alvéolo é um espaço delimitado por epitélio simples pavimentoso, formado por pneumócitos do tipo I e tipo II (FEHRENBACH, 2000). O pneumócito do tipo I possui pequena espessura, o que facilita a difusão de O<sub>2</sub> para o sangue. Na parede alveolar, esses pneumócitos são unidos por junções de oclusão que evitam a passagem de fluido extracelular para a luz do alvéolo. Já o pneumócito do tipo II possui corpos lamelares e secreta substância surfactante, composto lipoprotéico que é excretado pela célula, e tem a função de diminuir a tensão superficial, facilitando a expansão na inspiração e evitando o colapamento na expiração (BEYTUT, 2010).

A região formada pelos pneumócitos de dois alvéolos adjacentes é o septo interalveolar, com locais que chegam a medir menos de 2 µm de largura, onde acontecem as trocas gasosas (GARTNER & HIATT, 2007). A troca de O<sub>2</sub> presente nos alvéolos para o sangue e a troca de CO<sub>2</sub> presente no sangue para os alvéolos ocorre através do processo de difusão gasosa, pelas diferenças no gradiente de concentração dos capilares de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. No sangue, o O<sub>2</sub> é basicamente transportado para os tecidos do corpo através da ligação covalente com a hemoglobina do eritrócito, formando uma oxiemoglobina (SCHUBERT & ZHANG, 1997).

### **2.1.3. Mecanismos de defesa**

A área combinada das passagens de ar e superfície alveolar do trato respiratório representa a maior superfície epitelial do organismo animal exposta ao ambiente externo, somada com o enorme volume de ar inspirado contendo agentes comensais e nocivos. Como forma de suportar as eventuais agressões, conta com defesas robustas (ZIMMERMAN *et al.*, 2019). Os principais mecanismos de defesa do sistema respiratório suíno são: a atividade de filtração e de defesas imunes no epitélio dos cornetos nasais, o aparelho mucociliar no epitélio das vias respiratórias e as defesas imunes relacionadas principalmente às áreas de tecido linfóides associado aos brônquios (BALT) e macrófagos pulmonares (PALLARÉS *et al.*, 2019).

A maior parte do sistema respiratório é revestida pela mucosa respiratória, com epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, no qual se localiza o aparelho mucociliar (KONING & ERICH, 2016). O mecanismo de defesa mucociliar tem

como principal função a remoção de partículas ou substâncias potencialmente agressivas ao trato respiratório, sendo capaz de remover partículas com mais de 10 µm de diâmetro antes que possam atingir a árvore brônquica. Sua função é garantida pelo movimento ciliar e pelas células caliciformes responsáveis pela secreção de muco, o que garante um trânsito contínuo de partículas infecciosas e irritantes agregadas ao muco em direção à faringe, deglutição e saída pelas fezes, determinando uma limpeza contínua das vias respiratórias (TRINDADE *et al.*, 2007. PALLAEES *et al.*, 2019).

A esse mecanismo é adicionado o efeito da tosse, que é um mecanismo reflexo que atua na limpeza das vias aéreas inferiores através da propulsão do muco, secreções e outros materiais estranhos acumulados até a orofaringe. Outras atividades de defesa em relação às doenças infecciosas no trato respiratório inferior relacionam-se com a presença no muco de substâncias bactericidas e bacteriostáticas, que atuam na neutralização de patógenos, como lactoferrina, complemento, substâncias surfactantes, fibronectina, alfa- antitripsina e lisozima. Adicionalmente, é de grande importância o efeito das defesas imunes como as resultantes da secreção e efeito das imunoglobulinas A e G, que auxiliam na neutralização de vírus e bactéria (TRINDADE *et al.*, 2007; ZIMMERMAN *et al.*, 2019).

Associada à mucosa respiratória existem áreas de tecido linfóide secundárias à mucosa associadas aos brônquios do pulmão, semelhante a placas de Peyer do intestino delgado, denominadas “BALT- tecido linfóide associado aos brônquios”. A sua proliferação é induzida em resposta à exposição microbiana ou a outros tipos de inflamação pulmonar (TSHERING & PABST, 2000). Alguns desses aglomerados podem ser organizados como áreas de linfócitos B, linfócitos T, e células estromais especializadas, enquanto outros são pequenos aglomerados de linfócitos B com pouca organização (PABST, 2007). Nesse tecido, ocorre a interação entre os linfócitos e os antígenos de agentes patogênicos procedentes do exterior, originando uma resposta específica localizada e evitando uma resposta imune sistêmica (PALLARÉS *et al.*, 2020).

Outro importante mecanismo de defesa ocorre pela ação dos macrófagos pulmonares, esses são divididos em: macrófagos alveolares, que estão em contato com os pneumócitos do tipo I (células epiteliais alveolares) e tipo II (produtoras de substâncias surfactantes), e macrófagos intersticiais, localizados no interstício dos septos, entre o endotélio vascular e o epitélio alveolar (HUSSEL & BELL, 2014). Os macrófagos alveolares são a primeira linha de defesa contra poluentes e agentes patogênicos provenientes da inalação, possuindo dois fenótipos distintos. O fenótipo M1, chamado de macrófagos classicamente ativados, está

associado ao processo inflamatório com liberação de citocinas e recrutamento de outras células imunes no pulmão, e o fenótipo M2, que contribui à resolução da inflamação e reparação dos tecidos danificados (VIOLA *et al.*, 2019).

## **2.2. Complexo Respiratório Suíno**

As infecções respiratórias mistas em suínos, conhecidas como “Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos” (CDRS), geram grande preocupação na produção de suínos em todo o mundo. Causam uma doença multifatorial pela interação de fatores não infecciosos (ambiente, manejo, idade, genética e nutrição) com patógenos virais, bacterianos e/ou fúngicos (BOCHEV, 2007). Afetam principalmente animais de terminação entre 14 e 22 semanas de idade, resultando na diminuição do desempenho dos animais afetados e também gerando outros efeitos como aumento de mortalidade, condenações de carcaças em abatedouros, aumento nos gastos com medicamentos e menor eficiência econômica (THACKER *et al.*, 2001).

### **2.2.1. Principais agentes envolvidos no CDRS**

Os agentes infecciosos associados ao CDRS são classificados em patógenos primários, capazes de causar lesões respiratórias devido à sua própria virulência. Já os patógenos secundários ou oportunistas, necessitam da imunossupressão das defesas respiratórias provocada pelos agentes primários para causarem lesões significativas, havendo então, efeito aditivo/sinérgico entre agentes primários e secundários, aumentando a severidade de sinais clínicos e lesões, e gerando as assim chamadas “infecções polimicrobianas” (OPRIESSNIG *et al.*, 2011).

Os agentes primários causam lesões no trato respiratório que favorecem o estabelecimento das infecções secundárias, como nas infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae*, que coloniza as células epiteliais ciliadas do trato respiratório, danificando as células e prejudicando a função de proteção desempenhada pelo aparelho mucociliar (PACCE *et al.*, 2019). Outros agentes primários possuem a capacidade da imunossupressão do trato respiratório, como: vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSv), PCV2 e IAV (OPRIESSNIG *et al.*, 2011), podendo haver simultaneamente em uma infecção mais de um agente primário e/ou secundário.

Vários estudos em todo o mundo vêm sendo realizados para elencar os patógenos mais prevalentes e sua associação no CDRS, a fim de estabelecer os métodos mais adequados para controle e prevenção. Na Coreia do Sul, foi realizada a coleta de amostras de fluido oral em 214 grupos, contendo entre 20 e 25 suínos, de 3 a 26 semanas de idade em 56 granjas comerciais a fim de se estabelecer a prevalência de oito patógenos respiratórios: PRRSv, PCV2, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *P. multocida*, *G. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* e *S. suis*. Os patógenos mais frequentes foram *G. parasuis* (69,6%), *M. hyopneumoniae* (67,8%), *S. suis* (56,1%) e PRRSv (52,3%). Além disso, foram encontradas sete interações com correlações significativas entre os patógenos avaliados, mas ao total, foram encontradas 36 interações distintas (CHEONG *et al.*, 2017).

Na Dinamarca, Hansen e colaboradores (2010) avaliaram 148 pulmões de leitões com broncopneumonia crânioventral e encontraram uma ampla gama de lesões macroscópicas, que foram correlacionadas posteriormente com cinco espécies bacterianas, cinco vírus e dois micoplasmas em diferentes combinações. Foram detectados com maior frequência entre os leitões com CDRS os seguintes agentes: PCV2, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *P. multocida*, demonstrando a complexidade etiológica da síndrome.

Cada país ou região possui realidades distintas quanto aos agentes envolvidos no CDRS, como é o caso do PRRSv nos Estados Unidos (EUA) e Europa. Como no Brasil a PRRS é uma doença exótica, os agentes virais primários mais relevantes são o IAV e PCV2, enquanto que, os agentes bacterianos predominantes são *M. hyopneumoniae* e *A. pleuropneumoniae* (BARCELLOS *et al.*, 2008). Poucos trabalhos sobre a frequência das infecções respiratórias e sua interação no Brasil foram publicadas. Sabe-se que a importância da associação de agentes virais e bacterianos aumentou a partir dos surtos de circovirose ocorridos a partir 1999, e foi posteriormente agravada com a entrada do IAV (H1N1) em 2009. A partir de então, houve ampla disseminação de pneumonias associadas a diferentes combinações entre esses agentes nos rebanhos comerciais do Brasil (ZANELLA *et al.*, 2016).

Entre os anos de 2009 e 2015 foi realizado um estudo no Sul do Brasil a fim de analisar pulmões coletados de animais de diferentes fases com sinais clínicos respiratórios para caracterização dos principais agentes etiológicos envolvidos após a introdução do IAV no país. Dos 74 pulmões analisados no período, todos foram positivos para IAV, sendo observado a coinfeção de IAV com *M. hyopneumoniae* em 23 (31%) casos com a presença de lesões histopatológicas características desses agentes. Enquanto, 11 (14,9%) casos foram

positivos para o PCV2, porém sem a presença de lesões sugestivas para a doença (RECH *et al.*, 2018).

Esses resultados corroboram com a redução significativa de casos do PCV2 a partir de 2008, pela disponibilização das vacinas comerciais, mantendo a maioria dos rebanhos vacinados no Brasil numa forma de infecção subclínica ou assintomática (GUEDES, 2012). Por outro lado, o *M. hyopneumoniae* é um agente amplamente distribuído no Brasil, sendo responsável por grandes prejuízos pela presença de uma forma de doença clínica relacionada principalmente pela interação com outros agentes bacterianos e/ou virais nas fases de recria e terminação, chegando a ter prevalência de infecções ainda ativas em abatedouros de até 95,8% (PACCE *et al.*, 2019).

A interação entre o IAV subtipo H1N1 e *M. hyopneumoniae* foi estudada através da inoculação simultânea dos dois agentes em leitões de 10 a 12 dias de idade nos EUA (THACKER *et al.*, 2001). Foi verificado que os animais infectados com os dois agentes tiveram um quadro pneumônico severo por duas semanas e que tossiram mais do que os animais infectados com apenas um agente, e o mesmo ocorreu com o índice de pneumonia observado após 14 dias da inoculação. Porém, aos 21 dias após a inoculação, a severidade da pneumonia foi semelhante ao grupo infectado apenas com *M. hyopneumoniae* (THACKER *et al.*, 2001), o que em situações de campo poderia acarretar no envolvimento de agentes secundários agravando as lesões primárias.

Sendo assim, pelo fato das doenças clínicas causadas pelo PCV2 estarem controladas pela vacinação e pelo *A. pleuropneumoniae* estar mais relacionado a granjas endêmicas, o foco principal deste trabalho é abordar os patógenos primários IAV e *M. hyopneumoniae*, que são agentes endêmicos nos plantéis brasileiros, principalmente nas fases de crescimento e terminação (SCHAEFER *et al.*, 2011; MORÉS *et al.*, 2015). Além disso, esses agentes promovem a diminuição dos mecanismos de defesas fisiológicos do trato respiratório, contribuindo significativamente para o aumento da ocorrência de infecções bacterianas secundárias associadas (THACKER *et al.*, 2001).

### **2.2.2. *Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* é um microrganismo pequeno e autorreplicante que possui várias características que permitem habilidades biológicas limitadas, resultando em crescimento exigente e específico, e propriedades patogênicas únicas. Uma alta variabilidade entre cepas e

isolados de campo já foi descrita em vários níveis, mostrando a sua capacidade de se adaptar, gerando variações e diferenças entre as interações hospedeiro-patógeno (BETLACH *et al.*, 2019). Os micoplasmas não possuem parede celular, se diferenciando de outros procariotos.

É um patógeno extracelular que replica exclusivamente em células epiteliais respiratórias ciliadas que revestem as vias aéreas de suínos. Após a inalação, o *M. hyopneumoniae* atinge a camada mucosa do trato respiratório e adere aos cílios das células epiteliais da traqueia, brônquios e bronquíolos (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982). A infecção gera perda da eficiência do aparelho mucociliar e o aumento de produção de muco, o que oportuniza infecções secundárias. Além disso, induz os macrófagos a produzirem citocinas pró-inflamatórias, resultando em hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial, produzindo a pneumonia (ASAI *et al.*, 1996). Os tipos de lesões pulmonares mais frequentes na infecção pelo *M. hyopneumoniae* são caracterizados macroscopicamente por consolidação pulmonar com localização crânio-ventral e microscopicamente por broncopneumonia supurativa com hiperplasia de BALT (MORÉS *et al.*, 2015).

Até o momento, suínos domésticos, asselvajados e javalis foram os únicos hospedeiros que se infectam com *M. hyopneumoniae* (MAES *et al.*, 2018). Em granjas clinicamente afetadas, a soroconversão e a tosse aparecem após 1 a 6 semanas da infecção, com a sua excreção ocorrendo através da expiração de gotículas infectadas durante episódios de tosse e/ou por contato direto focinho a focinho (MAES *et al.*, 2018). O contato próximo entre suínos infectados e suscetíveis é a principal via de transmissão de *M. hyopneumoniae*.

O período de excreção é muito longo, podendo se estender por até 214 dias após a infecção em condições experimentais (PIETERS *et al.*, 2009). Em leitões de reposição oriundas de granjas positivas para *M. hyopneumoniae* a detecção é observada geralmente a partir dos 110 dias de idade, com aumento significativo aos 140 dias e permanecendo acima de 20% de prevalência entre 140 e 230 dias de idade, diminuindo a partir disso (TAKEUTI *et al.*, 2017). Dessa forma, leitões e matrizes jovens podem ser detectadas positivas próximo ao parto, sendo fontes de contaminação para leitões durante o período de lactação (PIETERS *et al.*, 2014). Essas observações sugerem que em infecções naturais, as leitões podem ser detectadas positivas por um a três meses em condições de campo, mas a detecção a longo prazo também pode ocorrer, o que poderia ser extrapolado também para leitões de terminação.

A doença clínica nos animais pode ocorrer através de surtos epidêmicos, quando *M. hyopneumoniae* é introduzido em rebanhos imunologicamente negativos, podendo atingir 100% de morbidade. Ou, na forma endêmica, com a maior prevalência na fase de terminação,

apresentando variabilidade na severidade dos sinais clínicos e lesões, de acordo com a cepa envolvida, pressão de infecção e presença de infecções secundárias (THACKER & MINION, 2012).

O sinal clínico predominante na infecção simples por *M. hyopneumoniae* é a tosse improdutiva principalmente em animais de terminação. O início é insidioso, afetando alguns animais e se espalhando lentamente, atingindo uma porcentagem considerável de animais. A tosse pode desaparecer após duas a três semanas, mas também pode persistir durante todo o período de terminação (ZIMMERMAN *et al.*, 2019). Sob condições de campo, a maioria das infecções por *M. hyopneumoniae* é agravada pela coinfeção com outras bactérias oportunistas ou por vírus respiratórios, e nesse caso, os sinais clínicos são mais graves e podem incluir distúrbios respiratórios severos, hipertermia, dispneia, prostração, apetite reduzido e, eventualmente, mortalidade (MAES *et al.*, 2018).

A detecção da infecção pelo *M. hyopneumoniae in vivo* é considerada um componente crítico para diagnóstico e medida essencial para o sucesso das estratégias do controle e/ou eliminação da doença. O isolamento bacteriano é um método confirmatório para a sua detecção; porém, é extremamente difícil, pois o patógeno necessita de meios específicos e de tempo elevado de incubação. Por isso, a PCR é amplamente empregada por sua alta especificidade e sensibilidade (MAES *et al.*, 2018). Recentemente, um estudo avaliou a sensibilidade de dois métodos de coleta de amostras para a detecção do agente através da técnica de PCR (suabe laríngeo e coleta de muco traqueal). A sensibilidade do muco traqueal mostrou-se em média 39% superior ao suabe laríngeo, independente da exposição (natural ou inoculação) e do momento de coleta pós-infecção (SPONHEIM *et al.*, 2020).

O tratamento dos animais afetados, principalmente na fase de crescimento e terminação é realizado com a terapia antimicrobiana, uma vez que a proteção vacinal não é completa. Devido à ausência de parede celular, *M. hyopneumoniae* é intrinsecamente resistente aos antibióticos beta-lactâmicos. Sendo assim, as drogas efetivas contra o agente incluem as tetraciclínas, macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas e fluoroquinolonas (GARZA-MORENO *et al.*, 2019a).

As leitões de reposição são consideradas um ponto chave na transmissão e controle da infecção pelo *M. hyopneumoniae*. Por este motivo, programas de aclimação têm sido incorporados nas granjas comerciais com o objetivo de reduzir a excreção bacteriana no primeiro parto, diminuindo a prevalência da colonização no pré-desmame e os possíveis problemas respiratórios na terminação (GARZA-MORENO *et al.*, 2017). Além disso, foi

verificado que a vacinação nas leitoas com duas ou quatro doses diminuiu significativamente a pressão infecciosa do patógeno na 14<sup>a</sup> semana após a chegada das leitoas no setor de aclimatação, diminuindo a proporção de fêmeas suínas positivas para *M. hyopneumoniae* e proporcionando na mesma semana, altos níveis de anticorpos (GARZA-MORENO *et al.*, 2019b).

Além disso, a vacinação de leitões aplicada em uma ou duas doses é amplamente utilizada (MAES *et al.*, 2018). A vacinação em dose única aos 7 e 21 dias de idade já foi testada e mostrou-se eficaz, reduzindo a prevalência de pneumonia ao abate de suínos com doença clínica respiratória entre 8,7 – 13,1%, durante a segunda metade do período de engorda (DEL POZO SACRISTAN *et al.*, 2014). Estudos nesta linha de pesquisa também demonstraram que a vacinação de leitões três dias antes do desmame pode conferir resultados melhores de ganho médio diário nas fases subsequentes em comparação a vacinação ao desmame, possivelmente devido à menor interferência do estresse ao desmame (ARSENAKIS *et al.*, 2017; MAES *et al.*, 2018). A influência de anticorpos maternos adquiridos pelo colostro no manejo de vacinação em leitões nestas fases não está totalmente elucidada (MAES *et al.*, 2018). Porém, já foi demonstrado que os anticorpos adquiridos passivamente podem ter pouco ou nenhum efeito na resposta vacinal dos leitões (MARTELLI *et al.*, 2006).

Em relação à erradicação do microrganismo, dois principais métodos vêm sendo estudados: método de fechamento do rebanho associado à medicação, e o método com apenas o uso da antibioticoterapia, com uso da vacinação em todo o rebanho em ambos os casos. Comparando estes métodos, estudos verificaram que o método com apenas a medicação do rebanho está associada a um maior risco de recontaminação nos primeiros meses após a erradicação, quando comparado ao método de fechamento de plantel (YESKE *et al.*, 2020).

Além disso, Silva *et al.* (2019) avaliaram o custo-benefício desses dois métodos de eliminação para *M. hyopneumoniae* em unidades produtoras de leitões até a fase de terminação, e concluíram que independentemente do método, os benefícios obtidos são maiores que os custos do projeto, mesmo que a granja permaneça negativa por apenas um ano. Quando comparados os dois métodos, foi observado que o fechamento do rebanho teve o retorno sobre o investimento em apenas dois meses após o início da comercialização dos leitões negativos, e de sete meses para o protocolo apenas com o uso de medicação com um retorno estimado em US\$ 7,00 por leitão comercializado



Outro método de erradicação deste agente é a depopulação, baseado no despovoamento e repovoamento da granja. É um protocolo mais simples, porém mais caro e com período de retorno maior (SILVA *et al.*, 2019). Variações deste método foram desenvolvidas, como o despovoamento parcial conhecido como método suíço, utilizado com sucesso em programas de erradicação do *M. hyopneumoniae* em países europeus. Porém, é um método que interrompe temporariamente o parto de granjas produtoras de leitões por pelo menos 2 semanas (STÄRK *et al.*, 2007). Na Suíça, os custos da erradicação com protocolos de despovoamento e repovoamento giram em torno de US\$ 600,00 por matriz (GIGER *et al.*, 2006). Independentemente do método utilizado, os benefícios da eliminação do agente são inúmeros e podem estar relacionados à melhoria do ganho de peso diário, economia do uso de antimicrobianos e melhoria na taxa de conversão alimentar.

### 2.2.3. Vírus da Influenza A

Após a entrada do vírus da Influenza A (H1N1) em 2009 no Brasil, a população suína apresentou surtos de H1N1 associados a doenças respiratórias, localizados principalmente nas principais regiões de produção de suínos (sul, centro-oeste e sudeste) do Brasil (NELSON *et al.*, 2015). A doença foi caracterizada por um quadro clínico respiratório agudo, acometendo grande número de suínos de várias faixas etárias, sendo considerado como o principal agente etiológico associado ao CDRS (SCHAEFER *et al.*, 2013). O surgimento do vírus H1N1 é um rearranjo entre vírus suíno e aviário, e desde então, a transmissão recorrente do IAV de humanos para suínos, conhecidos como eventos de zoonose reversa, foram observados em todos os continentes se espalhando na população suína (SOUZA *et al.*, 2018).

O vírus Influenza pertence à família Orthomyxoviridae, a qual compreende vírus envelopado de RNA de cadeia simples, com genoma viral contendo oito segmentos e cerca de 13kb, que codifica 13 proteínas. Dentre elas, duas glicoproteínas de superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), são responsáveis pela subdivisão dos subtipos dos vírus Influenza A, havendo 17 diferentes HAs (H1-H17) e nove NAs (N1-N9) (DUGAN *et al.*, 2008; TREGONING *et al.*, 2018). Dois mecanismos principais são responsáveis pela evolução molecular do vírus Influenza e pela mudança contínua na sua antigenicidade: “shift” antigênico e “drift” antigênico.

O “drift” antigênico é o processo de mutação natural e pontual nos genes de HA e NA, que ocorre ao longo do tempo devido à falta de atividade de revisão da enzima RNA polimerase. Pode permitir a evasão da imunidade preexistente do hospedeiro ou

incompatibilidade da vacina, gerando novas linhagens do mesmo subtipo viral (KAHN *et al.*, 2014). Já o “shift” antigênico é o processo pelo qual dois ou mais subtipos de Influenza infectam uma célula ou um hospedeiro e seus genomas segmentados se recombinam, gerando um novo subtipo, sendo imunologicamente distintos dos vírus Influenza circulantes. Esse mecanismo também é chamado de rearranjo (KAHN *et al.*, 2014). Neste mecanismo os suínos possuem um papel importante por possuírem receptores celulares de moléculas de ácido siálico em duas conformações diferentes, ficando susceptível tanto a infecções por vírus aviários como vírus humanos, permitindo a recombinação entre eles, com grande potencial patogênico e, eventualmente, pandêmico (ITO *et al.*, 1998).

Atualmente a fase mais afetada pelo IAV é a de creche, entre sete e 21 dias após alojamento, o que pode estar relacionada à queda de anticorpos neste período, aumentando a susceptibilidade dos animais (RAJÃO *et al.*, 2013; TAKEUTI & BARCELLOS, 2017). Porém, estudos verificaram que muitos leitões já são desmamados positivos para IAV e que possuem um importante papel na manutenção do agente nas granjas (DIAZ *et al.*, 2015), transmitindo o agente para leitões de outras leitegadas nas fases subsequentes. Além disso, têm se observado que leitões pertencentes a leitegadas de mãe-de-leite possuem mais chance de serem PCR positivos para IAV do que leitegadas oriundas da própria matriz e sem mistura (OR = 6,13; P < 0,05), contribuindo para o desmame de leitões já positivos (GARRIDO-MANTILHA *et al.*, 2021).

Após o desmame, a dinâmica de infecção do IAV é variável. Diaz *et al.* (2017) observaram três grupos distintos de Influenza, com 13 genomas virais identificados. Além disso, de 132 animais selecionados, 98,4% foram PCR positivos em algum momento para IAV, sendo que 87,9% foram positivos mais de uma vez. Evidenciou-se, portanto, que em uma mesma granja pode haver alta diversidade viral, permitindo a infecção e reinfecção do IAV ao longo do tempo.

O IAV, assim como *M. hyopneumoniae*, também apresenta um tropismo pelo sistema respiratório, onde se replica nas células epiteliais do trato respiratório superior. A infecção então se espalha para brônquios e bronquíolos, resultando em perda de cílios, extrusão de muco, exsudação de neutrófilos e macrófagos, e necrose e metaplasia do epitélio das vias aéreas (OPRIESSNIG *et al.*, 2011). Foi demonstrado que os níveis de certas citocinas, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , interferon- $\alpha$  e interleucina-1, são elevados entre 18 e 24 horas após a inoculação com IAV e correlacionam-se com os neutrófilos nas lesões bem como início e grau de sinais clínicos (CHARLEY *et al.*, 2006). Além disso, o dano induzido pelo IAV no

trato respiratório reduz a capacidade de eliminar a infecção e também diminui a função dos macrófagos, predispondo a ocorrência de infecções secundárias (THACKER *et al.*, 2001).

A doença pode surgir subitamente, já que a taxa de transmissão do vírus é alta, chegando a um animal infectado transmitindo para até 10 suínos susceptíveis (ROMAGOSA *et al.*, 2011). A excreção e transmissão viral ocorrem exclusivamente pela via respiratória através de secreções nasais ou orais, sendo que o vírus pode ser detectado nas secreções nasais em um a três dias após a infecção, e a excreção pode durar por cinco a sete dias (VICENT *et al.*, 2009). A facilidade na disseminação aérea do vírus se dá pelo tempo de permanência das partículas suspensas no ar, que pode chegar a 20 dias, com pico entre sete e 11 dias (NEIRA *et al.*, 2016). A infecção é autolimitante e endêmica, caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade. A fase aguda da doença começa entre um a dois dias após a infecção com o início de hipertermia, seguido de letargia e anorexia, podendo progredir para o desenvolvimento de tosse e dispneia. Em casos mais leves, os sinais clínicos podem diminuir com resolução da doença em sete a dez dias, se não houver o envolvimento de patógenos secundários (VICENT *et al.*, 2009).

As lesões macroscópicas caracterizam-se, na maioria dos casos, por consolidação pulmonar crânio-ventral de coloração avermelhada, nos lobos apicais, cardíacos e acessório. Em muitos casos são lesões pequenas e disseminadas, que geral aspecto lesional multifocal que tem sido referido como “tabuleiro de xadrez”. Experimentalmente as lesões ocorrem limitadas ao lobos apicais e cardíacos do pulmão, porém, a campo, essas lesões podem ser complicadas ou mascaradas por infecções simultâneas, especialmente bacterianas (ZIMMERMAN *et al.*, 2019). Em casos de infecção aguda severa observa-se congestão e edema pulmonar. A extensão das lesões pode variar de 22% (VINCENT *et al.*, 2010) a 30 % (SCHAEFER *et al.*, 2011) da área pulmonar. Nas lesões microscópicas pode-se observar bronquite e bronquiolite necrosante, infiltrado linfocítico peribronquiolar leve, pneumonia broncointersticial, necrose multifocal e acúmulo de neutrófilos e células descamadas no lúmen. Bronquiolite obliterante é relatada em casos severos, em que a exposição da lâmina própria induz à proliferação de fibroblastos, resultando na formação de pólipos bronquiais obliterando as vias aéreas (JANKE, 2014).

As melhores opções para o diagnóstico do IAV são RT-PCR convencional ou em tempo real e isolamento viral de amostras de suabe nasal ou fluido oral em suínos vivos na fase febril ou aguda da doença. Pulmão para análise por RT -PCR, isolamento viral ou imunohistoquímica é a amostra de escolha em suínos mortos (SCHAEFER *et al.*, 2013).

Recentemente, um estudo comparou diferentes métodos de coleta e observou que as estratégias de amostragem em grupo e ambientais são melhores que as individuais para conduzir a vigilância ativa; mas amostras individuais podem ainda ser necessárias para obter um isolado viral ou conduzir o sequenciamento de forma mais eficaz. Para as amostras individuais, a detecção através do suabe orofaríngeo é mais sensível em leitões lactentes, enquanto que para animais de crescimento/terminação a sensibilidade foi maior em suabes nasais (GARRIDO-MANTILLA *et al.*, 2019).

O vírus apresenta um envelope lipídico, sendo sensível a mudanças no ambiente físico como temperatura, pH e salinidade. Dessa forma, a manutenção inadequada das amostras biológicas, principalmente em condições de elevada temperatura, pode comprometer o diagnóstico pela inativação das partículas virais. Para evitar a redução de título viral, as amostras devem ser transportadas ao laboratório no menor tempo possível com meio de transporte e mantidas refrigeradas (4 °C). O congelamento de amostras do vírus a -20 °C não é indicado, uma vez que os cristais de gelo formados nessa temperatura inativam o vírus, com indicação a ser realizada a -80 °C (HAACH *et al.*, 2018).

A vacinação é um ponto importante para o controle do IAV porém, pela capacidade do vírus de realizar “drift” e “shift” antigênico há grandes desafios em seu uso. Quanto maior a semelhança da vacina com a cepa infecciosa a campo, melhor é a resposta imune (CARRAT *et al.*, 2007). Por este motivo, as vacinas devem ser continuamente atualizadas e modificadas para corresponder às cepas circulantes. A HA é a proteína viral mais abundante do IAV, compreendendo cerca de 80% das proteínas de membrana viral e o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas (EVERETT *et al.*, 2019). Todas as vacinas licenciadas atualmente disponíveis comercialmente são de vírus inteiros inativados contra as principais cepas endêmicas de suínos: H1N1, H1N2 e H3N2, em várias combinações (RAHN *et al.*, 2015). O uso de vacinas autógenas inativadas com cepas endêmicas para cada granja também vem aumentando, principalmente nos EUA, e pode ser uma alternativa mais eficaz comparada as vacinas comerciais, porém, estudos precisam ser realizados para comprovar qual a melhor alternativa (HAMISH *et al.*, 2021).

A biossegurança também é essencial para o controle do IAV. A introdução de animais infectados em uma granja livre é a principal fonte de infecção para qualquer doença. A implementação de quarentena em granjas multiplicadoras reduz a probabilidade do IAV se estabelecer em uma população livre, tendo em vista que muitos animais são portadores assintomáticos (HEINEN *et al.*, 2002). O sistema *all-in all-out* também é uma ferramenta

importante para evitar a perpetuação do agente nas instalações e a disseminação de um lote para outro (HAMISH *et al.*, 2021).

As estratégias de controle de biossegurança não devem ser limitadas apenas aos animais, mas também deve incluir os funcionários e o ambiente (YOO *et al.*, 2018; HAMISH *et al.*, 2021). Por isso, medidas como: permitir a entrada na granja apenas de pessoas essenciais, garantir que todos os funcionários e seus familiares sejam vacinados, e implementar uma boa higiene reduzem o risco de transmissão bidirecional e o surgimento de novas cepas (RAMIREZ *et al.*, 2006; YOO *et al.*, 2018). Em alguns sistemas, evitar a entrada de funcionários doentes e com hipertermia também são estratégias utilizadas (RAMIREZ *et al.*, 2006). No caso do ambiente, possuir tela a fim de evitar a entrada de aves nos galpões é essencial, assim como, evitar o uso de água de superfícies de lagoas as quais aves aquáticas tenham acesso (DUBLINEAU *et al.*, 2011).

### **2.3. Gerenciamento de doenças respiratórias e a Tosse**

Atualmente estudos vêm investigando a utilização da tosse para a detecção precoce de injúrias ou infecções respiratórias e para auxílio no diagnóstico de patógenos respiratórios (NATHUES *et al.*, 2012; LUEHRS *et al.*, 2017; RYT-HANSEN *et al.*, 2019; PESSOA *et al.*, 2021). Nesse sentido, um dos estudos avaliou a relação entre avaliações quantitativas manuais e automáticas de tosse e a prevalência de lesões pulmonares e verificou que tanto a tosse quanto as lesões pulmonares foram baias-específicas, ou seja, determinadas baias dentro das instalações possuíram um maior índice de tosse e lesões pulmonares do que outras. Além disso, houve concordância entre as medições contínuas do medidor SOMO e da contagem de tosse manual/semanal de tosse. Ainda, foi observado associação positiva entre a prevalência de pneumonia ao abate e tosse entre as semanas 22-24 de idade dos animais. Resultados que demonstram que a tosse pode ser uma importante ferramenta de monitoria sanitária nos plantéis (PESSOA *et al.*, 2021).

Nathues *et al.* (2012) associaram um método de avaliação de tosse com o diagnóstico laboratorial de *M. hyopneumoniae*, observando que em granjas onde mais de 50% dos fluidos broncoalveolares foram PCR positivos para *M. hyopneumoniae*, a probabilidade de um índice de tosse mais alto aumentou em 76% (OR: 1,76) em comparação com granjas com um percentual menor de amostras positivas. Os autores sugeriam que uma avaliação quantitativa de tosse, tipicamente seca e não produtiva, em suínos de terminação pode facilitar o diagnóstico de doenças respiratórias.

Por outro lado, Baraldi *et al.* (2019), não encontraram uma associação de tosse e lesões pulmonares com soropositividade de *M. hyopneumoniae* em suínos de terminação, a qual das 21 granjas avaliadas mais de 80% eram *M. hyopneumoniae* soropositivas e, 28,5% apresentavam problemas respiratórios ( $\geq 10\%$  dos animais avaliados com tosse). Estudos que utilizam sensores que captam os sons de tosse em galpões de suínos relatam diferenças na dinâmica da tosse (constante de tempo) entre animais desafiados com *Pasteurella multocida* e animais sadios com tosse induzida por nebulização de ácido cítrico (FERRARI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009). A diferença na dinâmica da tosse de acordo com a sua causa pode estar relacionada por mudanças na elasticidade do tecido pulmonar, onde o fluxo de ar é afetado pela mudança de elasticidade do pulmão e por áreas colapsadas (SILVA *et al.*, 2009).

Esses resultados demonstram que a tosse pode ser um indicativo de uma injúria respiratória e/ou presença de um agente infeccioso, porém, apenas o método de contagem pode ser um diagnóstico subjetivo para agentes infecciosos. No Brasil atualmente é comum a associação de tosse com doenças respiratória, onde, a porcentagem de animais afetados em um galpão é utilizada para a tomada de decisão da utilização massal de antimicrobianos para o tratamento dos animais. Porém, outros fatores podem estar associados a presença de tosse, como a ambiência, o que combinado com a utilização de antimicrobianos sem a real necessidade pode favorecer o aparecimento de isolados resistentes aos antimicrobianos.

#### **2.4. Relação Ambiente e Doenças Respiratórias**

A relação entre meio ambiente e doenças do sistema respiratório tem sido discutida há muitos anos (PIFFER *et al.*, 1983), devido às perdas econômicas ocasionadas por essas enfermidades. Straw (1983) demonstrou pioras no ganho de peso diário, e segundo Piffer *et al.* (1985), a cada 10% do parênquima pulmonar afetado há uma redução de 9,3% no desenvolvimento dos animais, podendo chegar a 14,7% quando associada à pleurisia. Neto & Lowenthal (1989) encontraram uma diminuição no ganho de peso dos animais com lesões de pneumonia e rinite atrófica, que correspondeu a cinco dias adicionais para atingir o peso de abate. Atualmente, mesmo com instalações modernas e manejos aprimorados, o desafio e as perdas com as doenças respiratórias ainda afetam a produção de suínos causando prejuízos. Estima-se que para cada 1% de lesão pulmonar há uma diminuição de 1,8 g no ganho de peso diário em suínos de terminação, e que, animais com menos de 15% de lesões pulmonares possuem um ganho de U\$ 6,55 por animal ao abate comparado a animais com maior percentual de lesão (FERRAZ *et al.*, 2020).

Além das variáveis ambientais, outros fatores podem estar associados a doenças respiratórias, como: falhas nutricionais, erros de manejo, instalações de baixa qualidade, presença de situações estressantes e doenças imunodepressoras. Estes fatores afetam primeiramente o trato respiratório superior, prejudicando os mecanismos de defesa das narinas e conseqüentemente a filtração de partículas infecciosas e poluentes suspensos do ar. Além disso, pode ocorrer prejuízo ao processo de umidificação e aquecimento do ar inalado, favorecendo o surgimento da doença clínica na produção de suínos (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Diante disso, novos estudos vêm sendo desenvolvidos afim de avaliar o impacto do ambiente na saúde respiratória dos animais e no seu desempenho. Recentemente, um estudo comparou lotes de suínos terminados em uma granja de ventilação mecânica com uma granja de ventilação natural, e observou-se que a granja com ventilação natural possuía um ambiente com menor conforto térmico, e maior detecção de gás carbônico e amônia nas instalações. Além disso, a chance de se obter amostras soropositivas para Influenza A foi 3,17 maior na unidade ventilada naturalmente ( $P = 0,003$ ), com ganho médio diário melhor na unidade ventilada mecanicamente com acréscimo de 9,2 g/dia (CHANTZIARAS *et al.*, 2020).

Michiels *et al.* (2015) verificaram que tanto a amônia quanto as partículas suspensas no ar causam efeitos diretos na saúde respiratória dos suínos. No caso da amônia, concentrações crescentes no galpão resultaram em maior chance de lesões de pleurisia (OR = 21,54;  $P = 0,003$ ), e também maior chance dos animais serem positivos através de PCR em amostras nasais para *M. hyopneumoniae* (OR = 70,39;  $P = 0,04$  na primeira metade da terminação e OR = 8275,05;  $P = 0,01$  na segunda metade).

Além dos gases, a temperatura e a sazonalidade também influenciam a saúde respiratória dos animais, podendo deixá-los mais susceptíveis a determinadas infecções. Com base nisso, Frédéric *et al.* (2021) buscaram determinar a prevalência de diferentes patógenos causadores do complexo respiratório suíno e suas variações durante diferentes estações, incluindo correlações com as condições climáticas locais. Entre os resultados obtidos, os autores observaram uma maior prevalência de patógenos respiratórios, incluindo *M. hyopneumoniae*, durante a estação de inverno em suínos de terminação. Encontraram também uma associação dos agentes com as condições climáticas, no qual a variação de temperatura foi negativamente associada a PRRSv-1 (OR = 0,921), PCV2 (OR = 0,834) e *M. hyopneumoniae* (OR = 0,818). Já, a direção do vento foi positivamente associada a *M.*

*hyopneumoniae* e PCV2 (OR = 1,026), e negativamente associada a PRRSv (OR = 0,981) (P < 0,0001).

Na tentativa de minimizar os problemas ambientais nas instalações, para movimentar e eliminar partículas de aerossóis poluentes suspensos no ar, a ventilação é um mecanismo utilizado. Porém, existe a necessidade de ajuste na regulagem dos níveis de ventilação, pois em excesso pode gerar correntes de ar e criar um ambiente frio para os leitões. No entanto, a estagnação do ar leva ao acúmulo de pó, gases, bactérias em suspensão e endotoxinas no interior dos galpões (BARCELLOS et al., 2008). No Brasil, o ajuste geralmente é feito pelo manejo manual das cortinas e muitas vezes é mal realizado, gerando grandes flutuações térmicas diárias na instalação. Estudos que associem a condição ambiental com a tosse, investigando infecções por agentes respiratórios são essenciais para enfatizar a importância da melhoria da ambiência nos galpões de alojamento. Por este motivo, o objetivo deste trabalho é verificar a associação de tosse com as condições ambientais das instalações e a presença de dois patógenos primários causadores de pneumonia em suínos (*M. hyopneumoniae* e IAV) através de uma avaliação clínica longitudinal individual na terminação e ocorrência de lesões pulmonares, bem como, seu impacto no desempenho.



### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Coughing in finishing pigs: its association with environmental parameters and primary pathogens of pneumonia**

##### **Abstract**

This study aimed to verify the association of cough with the environmental conditions of the facilities and the presence of two primary pathogens causing pneumonia in pigs (*M. hyopneumoniae* and Influenza A Virus (IAV)) through an individual longitudinal clinical assessment on the finish stage and occurrence of lung injuries, and their impact on performance. One thousand two hundred pigs from two finishing barns on the same farm were used. Animal origin, nutrition, stocking density, health management and management were the same for both units, except for the curtains management. In each barn, 5 sampling points were defined: one at each extremity and three between them. Environmental and clinical monitoring were performed daily, morning and afternoon, at each point from 110 to 210 days of age (slaughter). Measurements of the concentration of NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, relative humidity, and temperature of each point/barn were made. After, the individual clinical evaluation was performed through the coughing count in each pen. Sixty pigs/barn were collected for PCR detection of *M. hyopneumoniae* and IAV, *in vivo*. At slaughter, 970 lungs were macroscopically evaluated and 254 lungs samples with lesions of different severity were collected for histological evaluation and detection of both agents. Pigs were individually weighed at the beginning of the evaluations and at pre-slaughter (110 and 203 days of age). All data were analyzed using SAS® Software with a significance level of 5%. There was a higher coughing count in the morning shift compared to the afternoon shift ( $3.8 \pm 0.3$  vs.  $2.5 \pm 0.2$  coughs/assessment/point;  $P < 0.01$ ). Moreover, the two sampling points at the barns extremity had higher counts ( $P < 0.01$ ). Coughing count increased within: weeks of housing ( $r = 0.70$ ;  $P < 0.01$ ), NH<sub>3</sub> concentration ( $r = 0.50$ ;  $P < 0.01$ ), relative humidity ( $r = 0.18$ ;  $P < 0.01$ ), and CO<sub>2</sub> concentration ( $r = 0.09$ ;  $P < 0.01$ ). Negative correlation coefficients were observed with minimum temperature ( $r = -0.17$ ;  $P < 0.01$ ) and temperature variation ( $r = -0.06$ ;  $P = 0.02$ ). There was no association of cough with lung lesions (macro and microscopic) and *M. hyopneumoniae* detection at slaughter ( $P > 0.05$ ). Lungs with microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and/or IAV had more chance ( $P < 0.01$ ) to have more severe lesions than lungs with no lesions (OR = 3.7; 14.0 and 60.0 for *M. hyopneumoniae*, IAV and *M.*

*hyopneumoniae* + IAV, respectively). Piglets that had  $\geq 6$  episodes of coughing (class 4 and 5) during the assessments had significantly lower ADG ( $1.02 \pm 0.01$  and  $0.98 \pm 0.02$  kg/d, respectively) compared to pigs that did not cough (Class 0;  $1.09 \pm 0.01$  kg/d) ( $P < 0.01$ ). In conclusion, coughing has different patterns according to the environmental quality of the facilities, which could negatively affect the pig's respiratory condition, impacting their performance.

**Keywords:** Coughing count. Environment. Influenza A virus. *Mycoplasma hyopneumoniae*. Performance.

## 1. Introduction

The porcine respiratory disease complex (PRDC) is a constant concern in swine production worldwide (MERIALDI *et al.*, 2012), and is characterized by a combination of environmental risk factors and primary infectious agents (SIBILA *et al.*, 2009). Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSv), IAV, *M. hyopneumoniae*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* are widely distributed in pig herds, mainly in the growth and finish stages (MORÉS *et al.*, 2015; RECH *et al.*, 2018), which may lead to the association of infection with opportunistic agents.

The economic losses reported are dependent on the agents involved. In the case of the Influenza A virus (IAV), the losses are estimated between US\$ 3.23 and US\$ 10.23 per piglet produced in a wean-to-finish system in the USA (DONAVAN, 2005; HADEN *et al.*, 2012). For *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae*, these losses or the opportunity to gain up depend on the extension of macroscopic lung lesions, reaching up to US\$ 6.55 per piglet at slaughter (FERRAZ *et al.*, 2020). In addition, PRDC is also the main reason for antimicrobials use in growing and finishing pigs (PESSOA *et al.*, 2021), which may contribute to the emergence of resistant bacterial strains and a risk to public health.

The impact of environmental factors, such as ventilation, ammonia (NH<sub>3</sub>), particulate matter, temperature, seasonality, and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) levels, on PRDC has been previously studied (NI *et al.*, 2008; MICHIELS *et al.*, 2015; CHANTZIARAS *et al.*, 2020; VANGROENWEGHE & THAS *et al.*, 2021). Each one of these factors has a mechanism to decrease the respiratory system defenses in pigs. Depress ciliary activity and mucus flow are described when high NH<sub>3</sub> levels are detected inside the barn (STOMBAUGH *et al.*, 1969).

On the other hand, CO<sub>2</sub> seems to be less harmful to respiratory animal health (NI *et al.*, 2008).

Regardless of the cause, coughing is the most common clinical sign of respiratory disease, which can be an excellent tool for health monitoring in the field (NATHUES *et al.*, 2012; LUEHRS *et al.*, 2017; RYT-HANSEN *et al.*, 2019; PESSOA *et al.*, 2021). It has been reported that a single quantitative assessment of cough in finishing pigs before the slaughter could be used to diagnose Enzootic Pneumonia associated with *M. hyopneumoniae* (NATHUES *et al.*, 2012) and IAV detection (RYT-HANSEN *et al.*, 2019). However, in another study *M. hyopneumoniae* infection was not associated with the presence of cough, as expected (BARALDI *et al.*, 2019), demonstrating that cough is an important tool for respiratory monitoring, but could be a subjective diagnosis for respiratory pathogens.

The association of cough with respiratory diseases is common, where the percentage of affected animals in a barn is used for the decision-making of the mass antimicrobials usage. However, other factors may be associated with the presence of cough, such as the environment, which combined with the antimicrobials use without the real need could favor the emergence of isolates antimicrobial resistant.

Studies that do not associate cough only with infectious pathogens are scarce and necessary for its better understanding and management. There are no studies available associating environmental factors with *M. hyopneumoniae* and IAV, and demonstrating the impact of coughing on swine production, regardless of the cause. Thus, this study aimed to verify the association of cough with the environmental conditions of the facilities and the presence of two primary pathogens causing pneumonia in pigs (*M. hyopneumoniae* and IAV) through an individual longitudinal clinical assessment on the finish stage and occurrence of lung injuries, and their impact on performance.

## **2. Material and methods**

The Ethical Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the use of animals in this study (#39866).

### **2.1 Local, animals, housing, and feeding**

The study was carried out on a finishing farm in the mid-western region of Santa Catarina, Brazil, from March to June 2021. Each barn had 44 pens with the same physical

structure and a maximum capacity of 30 animals per pen with a density of 0.9 m<sup>2</sup> per pig. The barns were composed of male and female pigs. Each sex was housed in one side of the barn. Each pen had 1/3 partially slatted floor, one automatic feeder and two pendular nipple drinkers. The swine manure management was carried out twice a week by draining the ditch. Curtain control was manual in two barns and automatic in the other two, regulated by temperature sensors. The curtains in the automatically controlled barns were set to open when the temperature reached 24 °C and to close when reached 18 °C.

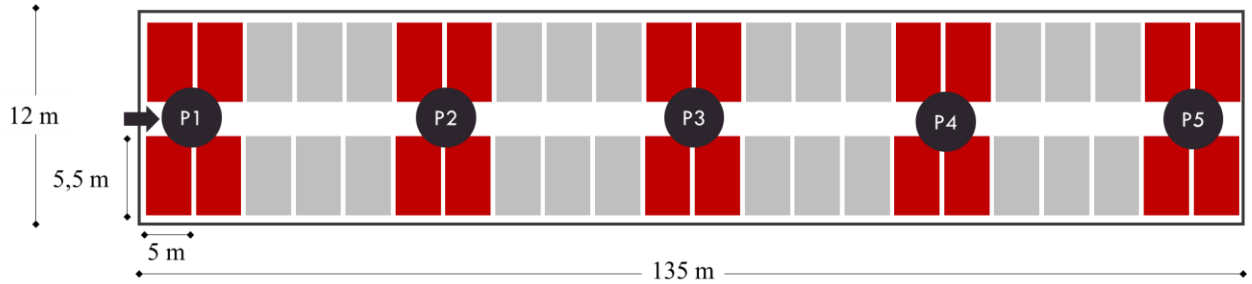
Pigs were born in the same farrowing farm and were housed in the same nursery single-origin *M. hyopneumoniae* and IAV endemic, and *A. pleuropneumoniae* stable, diagnosed by clinical signs, macroscopic lesions, and laboratory tests carried out in materials collected during routine monitoring. Vaccine against *M. hyopneumoniae* (Ingelvac Mycoflex, Boehringer Ingelheim®, Germany) and Porcine Circovirus Type 2 (Hyogen, Ceva Santé Animale®, U.S.A) were administered at weaning and against *Pasteurella multocida* (Govaxx, Biovet®, Brazil) at 35 and 55 days of age as part of the vaccination protocol. Males were immunocastrated according to the usual protocol of the company, with the second dose applied five weeks before slaughter (Vivax, Zoetis®, U.S.A.). Pigs had *ad libitum* access to water and the feeding protocol was the standard of the company, meeting the nutritional requirements at each phase of life, in agreement with Nutrient Requirements of Swine (NRC, 2012). The preventive antibiotic medication in feed during the finishing phase included Tiamulin 80% (10 mg/kg) at 40 days of housing, Florfenicol 40% (10 mg/kg) at 90 days, and Florfenicol 10% (4 mg/kg) in two weeks before slaughter.

## 2.2 Experimental design

The longitudinal trial was carried out in two barns of the farm with a total housing capacity of 1320 pigs/barn: one barn with manual curtain management (A) and another with automatic curtain management (B). Throughout the experiment the evaluations were carried out at five points of each barn. Each point comprised four pens, two on each side of the barn, selected according to Rotolo *et al.* (2017) as demonstrated in **Figure 1**. At the beginning of the finishing phase (approximately 63 days of age), the pigs were equally distributed within pens, housing a total of 30 animals per pen. In total, 20 pens with 30 animals/pen in each barn were selected, totaling 600 pigs per barn and 1200 for the trial. Pigs from the pens selected for the trial were ear-tagged and weighed individually at evaluation onset and one week before slaughter (110 and 203 days of age) to calculate the total weight gain in the phase and the

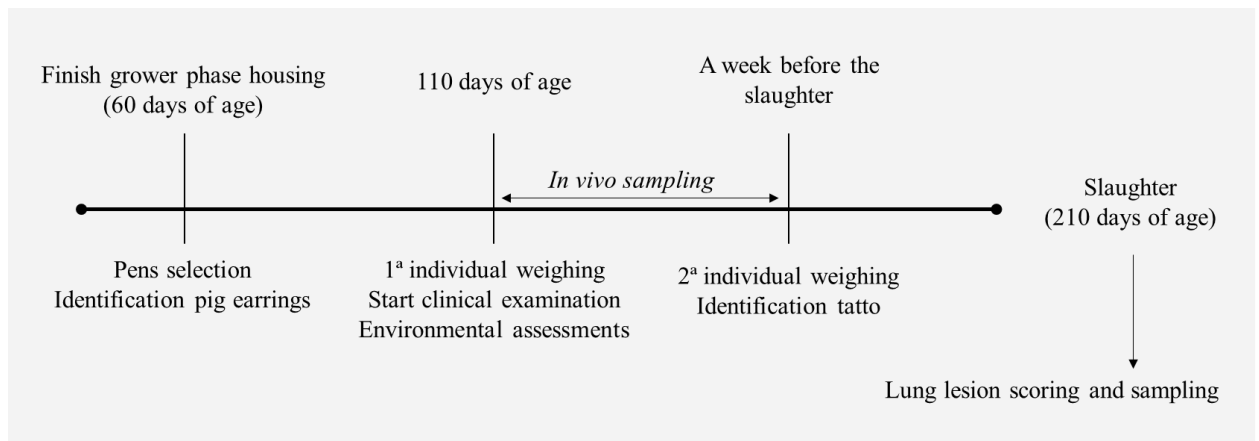
daily weight gain (ADG). Before slaughter the pigs were tattooed. The trial timeline are presented in **Figure 2**.

**Figure 1** - Schematic overview of selected pens in each barn (A and B) and sampling points used in the trial (P1 to P5).



Arrow indicates the entrance to the barn. Red rectangles represent the pens selected for the trial. P1, P2, P3, P4, and P5 indicate the sampling points.

**Figure 2** – Trial timeline.



### 2.3 Environmental data

Dataloggers (Datalogger 174T, Testo®, Brazil) were used to take continuous measurements of temperature in each sampling point. Through these measurements, the temperature variation between evaluations was calculated. The relative humidity of the air and CO<sub>2</sub> concentration was measured with specific equipment (Co<sub>2</sub>77, Akso®, China) with simultaneous measurement of CO<sub>2</sub> and accuracy of 30 ppm. In addition, NH<sub>3</sub> emission was assessed with a portable electrochemical single-gas detector reading (SP2nd NH<sub>3</sub>, Akso®, China). All the environment variables were registered twice a day at each sampling point at

7:00 AM and 4:00 PM. The sensors were located in the center of each point at a height of approximately 1.0 m. The position of the environmental sensors was carefully selected and pre-tested to avoid any exposure to air drifts, as described by Chantziaras *et al.* (2020).

## **2.4 Clinical examination**

Clinical evaluation started at 110 days of pigs age, due to in under field conditions, detection of *M. hyopneumoniae* by PCR begins around this age (TAKEUTI *et al.*, 2017a). Clinical evaluations were performed daily twice a day until slaughter, after the environmental analyses. In each pen, pigs were forced to move by 1 min. The number of coughs bouts was counted for 3 min. Pigs could have more than one cough bout counted within the period of observation when cough was absent for 10 s before reappearing (NATHUES *et al.*, 2012). The average number of pigs coughing per evaluation was counted per pen. All pigs which presented coughing were identified.

## **2.5 In vivo sampling**

Sixty animals per barn that presented coughing in two out of four consecutive evaluations were selected for a nasal swab and deep tracheal sampling for detection of IAV and *M. hyopneumoniae* by PCR, respectively. Samplings were carried out throughout the trial on alternate weeks. The sample size of pigs collected *in vivo* was calculated considering 600 animals evaluated per barn, 5% of prevalence, and a confidence level of 95%. Deep tracheal catheters were collected inserting the catheter (PC Sonda, Minitube®, Germany) into the trachea with the aid of a mouth gag and a laryngoscope, as described by Sponheim *et al.* (2020). After that, the tip of the catheter was cut and stored into a sterile microtube containing 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) at -20 °C until laboratory processing. Nasal swabs were collected by inserting 2-4 cm into each nostril and rotating gently (GARRIDO-MANTILLA *et al.*, 2019). The swabs were stored in a universal transport medium (UTM™, Copan, U.S.A) at -80 °C until laboratory processing.

## **2.6 Lung lesion scoring and sampling**

A total of 970 lungs (463 from barn A and 507 from barn B) were evaluated for macroscopically visible lesions at slaughter. The lungs were evaluated according to the methodology described by Madec & Kobisch (1982). Each lobe was scored from 0 to 4 for pulmonary consolidations, where: 0 = normal lobe, without consolidation, 1 = from 1 to 25%

of the lobe with consolidation, 2 = from 26% to 50%, 3 = from 51% to 75%, and 4 = from 76% to 100% of the affected lobe area with consolidation injury. Moreover, each pulmonary lobe contributed independently to the scoring according to its proportion concerning the total lung area (CHRISTENSEN *et al.*, 1999). The number of lungs of each category was multiplied by its own category number, then added together named as total index. The total index divided by the number of examined lungs resulted in the pneumonia index for each pen (BARALDI *et al.*, 2019).

After the lungs score evaluation, 254 lungs (116 from barn A and 132 from barn B) were selected for sampling for histopathological examination and *M. hyopneumoniae* and IAV detection, which following criteria: control group: lungs without pulmonary consolidations (n=15); mild group: with apical and/or cardiac lobes consolidation (n=118); severe group: with disseminated consolidation lesion (n=121). A fragment of approximately 15 × 10 cm from the transitional area of each lung was sampled and bronchial swabs were collected by inserting rayon swabs (Copan, U.S.A) through the bronchus, and a lung fragment measuring approximately 2 cm<sup>3</sup> was collected and fixed in a 10% neutral buffered formalin for histopathological examination. The swabs were stored in a universal transport medium (UTM™, Copan, U.S.A) at -80°C, for further *M. hyopneumoniae* and IAV detection by PCR.

## 2.7 DNA extraction and PCR

DNA extraction of the deep tracheal catheters was performed from 200 µL of the sample stored with 1 mL of PBS. For the nasal and bronchial swabs, the processing occurred from 200 µL of the homogenized transport medium. The DNA/RNA extraction of all samples was performed with a commercial extraction DNA/RNA kit based on magnetic beads (MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit, Thermo Fisher Scientific®, U.S.A) as recommended by the manufacturer. The PCR for *M. hyopneumoniae* was performed in all samples of deep tracheal catheters and bronchial swabs, according to Takeuti *et al.* (2017b). The RT-PCR for IAV was performed in all samples of nasal and bronchial swabs as described by CDC (Centers for Disease Control, USA; World Health Organization) (WHO, 2009). In each plate, positive and negative controls were added.

## 2.8 Histological analysis

Each lung fragment was embedded in paraffin, and the tissue slides were stained with hematoxylin and eosin (HE) (ALLEN, 1992). The presence of lymphocyte infiltration in

bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) was considered indicative of *M. hyopneumoniae* infection (BLANCHARD *et al.*, 1992). Samples suspected of Influenza A virus infection were that presented lesions of suppurative necrotizing or proliferative bronchiolitis/bronchitis associated or not with bronchointerstitial pneumonia or/and bronchiolitis obliterans and fibrous tissue (WATANABE *et al.*, 2012).

## 2.9 Statistical analyses

All data were analyzed using Statistical Analysis System Software (SAS<sup>®</sup>, version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Results were considered significant at a  $P \leq 0.05$ .

For the environment data and coughing counts were analyzed with proc GLIMMIX, considering barn (A and B), shift (morning or afternoon) and their interaction as fixed factors, and sampling point, as the experimental unit. Coughing count was analyzed as negative binomial distribution. The comparisons were performed with Tukey-Kramer test. Pearson correlation coefficients between environment conditions and coughing count were calculated with PROC CORR. Descriptive values of coughing count and NH<sub>3</sub> concentration were used to represent the pattern between barns throughout the evaluation period. To investigate difference among the sampling points for coughing count, barn, sampling point and their interaction were included in the model.

PCR detection between barns was analyzed with PROC GLIMMIX, considering the sampled animal as an experimental unit. Animals were divided in two groups, according to the coughing episodes: with at least one cough episode observed, and pigs no cough observed. These two classes were compared for high extension of lung lesions ( $> 31.3\%$  of lesions), through logistic regression model (PROC GLIMMIX), assuming binary distribution. This value of 31.25% was established based on the median of macroscopic lung lesions observed in both barns. Similarly, these classes were also compared for PCR-positiveness for *M. hyopneumoniae* in sample lungs collected. Severity of pulmonary consolidation classes were compared for the PCR-positiveness for *M. hyopneumoniae* and for microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and IAV infections by logistic regression models. Multinomial logistic regression analysis (PROC GLIMMIX) was used for modeling the probability of lungs grouped as severe (disseminated consolidation lesion) among the different associations between *M. hyopneumoniae* and IAV, based on the suggestive microscopic lesions. For the pneumonia index and the mortality + removal rate analyses, pen



was considered as an experimental unit. Binomial distribution was fitted for mortality + removal rate.

A regression model (PROC REG) was performed to estimate the linear relationship between cough and the pigs ADG during the evaluation phase. Furthermore, pigs were classified into six classes, based on total number of cough observed during the evaluation phase: Class 0: animals which not presented coughs; Class 1: animals which presented 1 cough; Class 2: animals which presented 2 or 3 coughs; Class 3: animals which presented 4 or 5 coughs; Class 4: animals which presented between 6 to 9 coughs; Class 5: animals which presented above 10 coughs during the trial. Classes of pigs with coughs observed were compared with the Class 0, through the Dunnett's test. For ADG analysis according to cough classes, animal was considered as an experimental unit.

### 3. Results

#### 3.1 Environment conditions and coughing counting

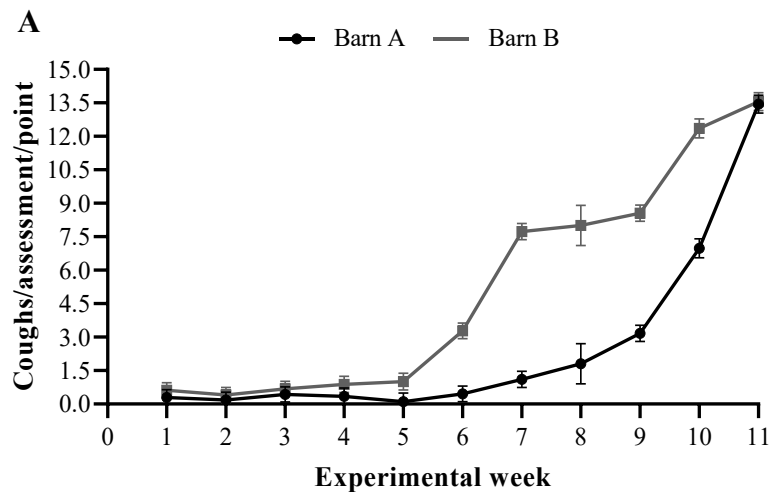
Environmental parameters according to shift and barn are shown in **Table 1**. NH<sub>3</sub> concentration was affected by the interaction between barn and shift ( $P < 0.01$ ), where in the morning evaluations, barn B had greater concentration than barn A, with no difference between them in the afternoon. Within barn A, the NH<sub>3</sub> concentration did not differ between shifts, while in barn B, greater concentration was observed in the morning shift. It was also observed an interaction between barn and shift ( $P < 0.01$ ) for the relative humidity. Besides the relative humidity was higher in the morning than in the afternoon shift in both barns, barn A had greater relative humidity than barn B in morning assessments, while no difference between them was observed in the afternoon shifts. Minimum temperature was also influenced by the interaction between barn and shift ( $P < 0.01$ ). In both barns the minimum temperature was lower in the morning than in afternoon shift. In the morning evaluations, the minimum temperature did not differ between the barns; however, in the afternoon, barn A had lower minimum temperature than barn B. Barn A showed greater temperature variation ( $8.2 \pm 0.1$  vs.  $7.1 \pm 0.1$  °C;  $P < 0.01$ ) and lower CO<sub>2</sub> concentration A ( $1627.7 \pm 21.2$  vs.  $1544.6 \pm 21.2$  ppm;  $P < 0.01$ ) than barn B. No significant effects of shift and interaction were observed for temperature variation and CO<sub>2</sub> concentration ( $P > 0.17$ ).

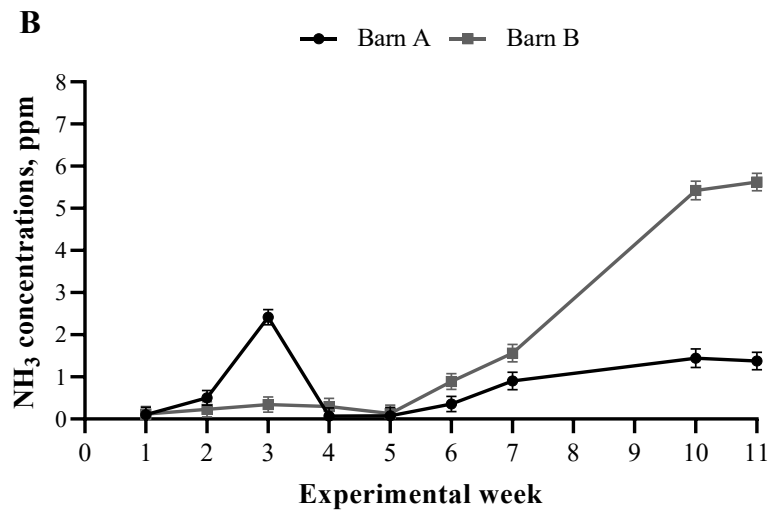
The general coughing count was 3.7 coughs/assessment/point. Coughing count was not affected by the interaction between barn and shift. However, more episodes of coughs

were observed in the morning when compared to the afternoon shift ( $3.8 \pm 0.3$  vs.  $2.5 \pm 0.2$  coughs/assessment/point;  $P < 0.01$ ). Moreover, barn B had greater coughing count than barn A ( $4.3 \pm 0.3$  vs.  $2.2 \pm 0.2$  coughs/assessment/point;  $P < 0.01$ ).

Coughing count increased within weeks of housing ( $r = 0.70$ ;  $P < 0.01$ ),  $\text{NH}_3$  concentration ( $r = 0.50$ ;  $P < 0.01$ ), relative humidity ( $r = 0.18$ ;  $P < 0.01$ ), and  $\text{CO}_2$  concentration ( $r = 0.09$ ;  $P < 0.01$ ); while negative correlation coefficients was observed with minimum temperature ( $r = -0.17$ ;  $P < 0.01$ ) and temperature variation ( $r = -0.06$ ;  $P = 0.02$ ). Patterns of increasing coughing count and  $\text{NH}_3$  concentrations in each barn throughout the trial are shown in **Figure 3**.

**Figure 3** - Mean coughing count and  $\text{NH}_3$  concentration according to the week assessments in each finishing barn.





Mean  $\pm$  SEM. Trial week 1 corresponds to 110 days of. Barn A: manual curtain management. Barn B: automatic curtain management.

1

2

**Table 1** - Environment condition according to the barn and shift and its interaction.

Environment condition	Barn/Shift				P-value		
	A*		B*		Barn	Shift	Barn x Shift
	Morning	Afternoon	Morning	Afternoon			
NH <sub>3</sub> (ppm)	0.6 ± 0.1b	1.0 ± 0.1b	1.7 ± 0.1a	1.0 ± 0.1b	<0.01	0.39	<0.01
Relative humidity (%)	82.5 ± 0.8a	65.3 ± 0.8c	79.1 ± 0.8b	67.1 ± 0.8c	0.30	<0.01	<0.01
Minimum temperature (°C)	17.3 ± 0.1c	17.8 ± 0.1b	18.1 ± 0.1bc	19.3 ± 0.1a	<0.01	<0.01	<0.01
Temperature variation (°C)	8.4 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.2 ± 0.2	7.1 ± 0.2	<0.01	0.17	0.45
CO <sub>2</sub> (ppm)	1545.4 ± 28.9	1543.8 ± 31.1	1620.7 ± 28.9	1634.7 ± 31.1	<0.01	0.84	0.79

\*Barn A: manual curtain management. Barn B: automatic curtain management.

Mean ± SEM.

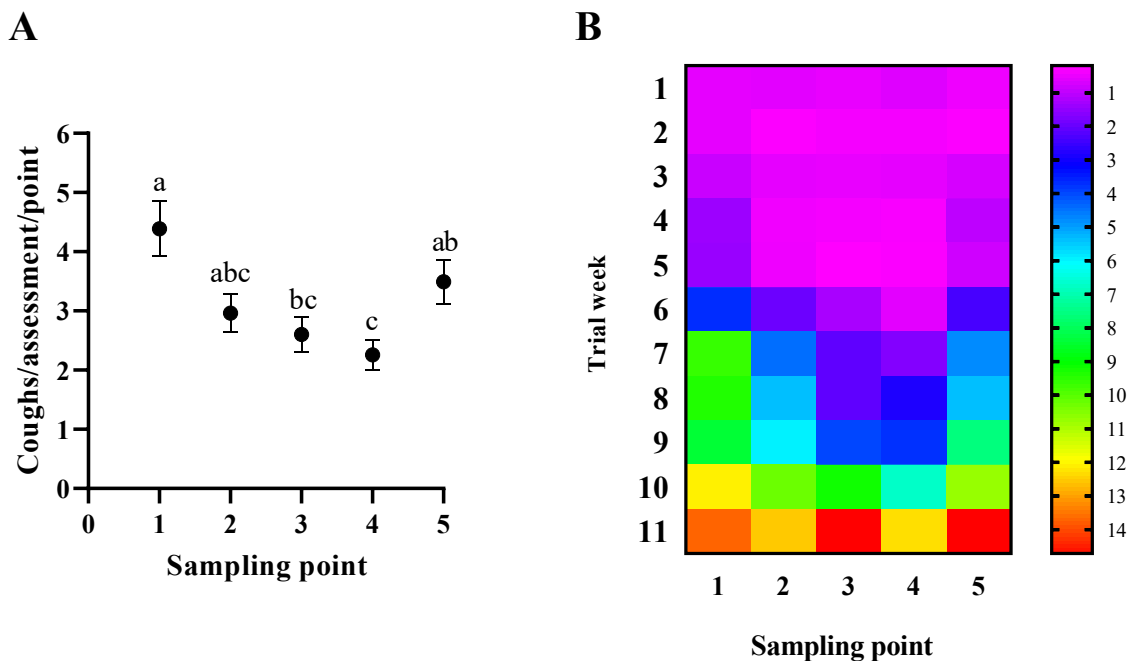
a,b,c: indicate significant difference in the line by the Tukey-Kramer test ( $P \leq 0,05$ ).

3

4

Since no significant interaction between barn and sampling point ( $P = 0.13$ ) was observed, coughing counting data was explored by the sampling point. Coughing count differed among the sampling point ( $P < 0.01$ ) and more coughs were counted in both barn in sampling points 1 and 5 (**Figure 4.A**). Additionally, **Figure 4.B** shows that coughing dynamic among sampling point over the study weeks, where point 1 and 5 presented an early increased in coughing counts.

**Figure 4** - Average coughing count according to the point assessed (A) and average of coughing count in each assessment (shift) according to the study week and sampling point (B).



Mean  $\pm$  SEM. a, b, c: indicate significant difference between sampling points by the Tukey-Kramer test ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.2 PCR detection and lung lesions

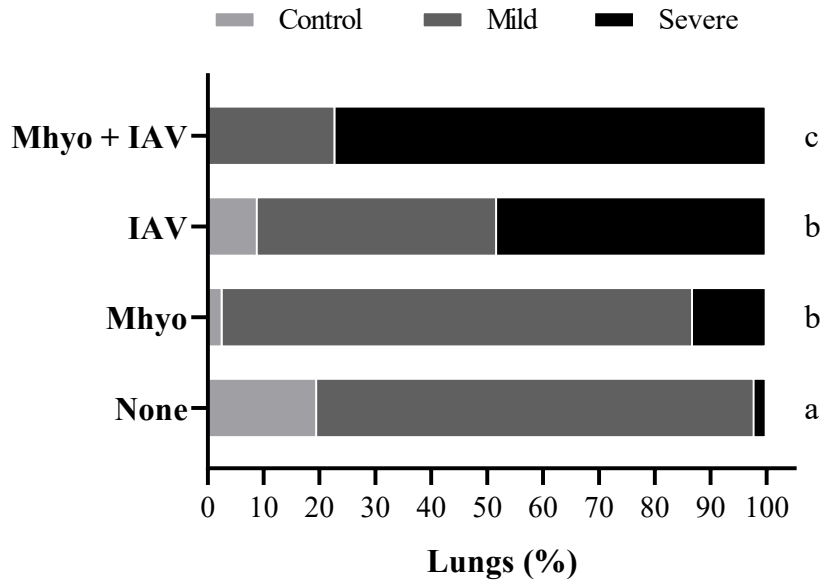
Regarding *in vivo* sampling, out of the 120 pigs that presented two episodes of coughs in four consecutive evaluations, 107 (89.9%) were *M. hyopneumoniae* positive, and two (1.7%) were IAV positive by PCR. Barns A and B showed similar PCR detection *in vivo* for *M. hyopneumoniae*,  $93.2 \pm 3.3$  (55/59) vs.  $86.7 \pm 4.4$  (52/60), respectively ( $P = 0.2$ ).

A total of 970 lungs were macroscopically evaluated. The extensions of macroscopic lung lesion averaged 33.8% and 31.3% was the median. Pulmonary lesions were more

extended in pigs from barn A than B ( $35.6 \pm 1.0$  vs.  $32.3 \pm 1.0$  %;  $P = 0.02$ ). However, the pneumonia index did not differ between barns ( $3.8 \pm 0.1$  vs.  $3.5 \pm 0.1$ , for barn A and B, respectively;  $P = 0.09$ ). The group with at least one cough episode had similar proportion of pigs with high lung lesion extension than the group with no coughing observed ( $49.3 \pm 1.8\%$  vs.  $53.2 \pm 3.5\%$ ;  $P = 0.33$ ). From the 254 lung samples, 85.3% were *M. hyopneumoniae* positive and 1.2 % were IAV positive by PCR. Additionally, no statistical difference ( $P = 0.37$ ) was found between pigs with or without cough and lungs positive for *M. hyopneumoniae* by PCR ( $86.3\% \pm 2.0$  vs.  $81.2\% \pm 5.6$ ). *M. hyopneumoniae* detection by PCR increased according to the severity of pulmonary consolidation ( $33.3\% \pm 12.1$ ;  $77.8\% \pm 3.8$  and  $99.2\% \pm 0.8$ , for control, mild and severe groups, respectively,  $P < 0.01$ ). No difference was observed in *M. hyopneumoniae* detection by PCR in lung samples between barns ( $85.3$  vs.  $85.4\%$ , for barn A and B, respectively;  $P = 0.46$ ). Furthermore, no significant effect of severity class of lung lesions was observed ( $P = 0.97$ ) for coughing count ( $3.5 \pm 0.9$ ,  $3.6 \pm 0.3$ , and  $3.7 \pm 0.3$ , for control, mild and severe, respectively).

The occurrence of microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and IAV infection according to the lung severity are shown in **Figure 5**. Lungs with microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and/or IAV infection had more chance ( $P < 0.01$ ) to have more severe lesions than lungs with no lesions (OR = 3.7; 14.0 and 60.0 for *M. hyopneumoniae*, IAV and *M. hyopneumoniae* + IAV, respectively). No difference between barns was observed for microscopic lesions for *M. hyopneumoniae* and/or IAV (**Table 2**;  $P > 0.05$ ).

**Figure 5** - Suggestive microscopic lesions percentage of *M. hyopneumoniae* and IAV according to lung lesion severity in the finishing pigs.



a, b, c: indicate significant difference between lungs with the lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* and/or IAV and lungs without lesions suggestive of the agents ( $P < 0.01$ ).

Mhyo: *M. hyopneumoniae*.

None: No suggestion of *M. hyopneumoniae* and IAV microscopic lesion.

Lesions suggestive of *M. hyopneumoniae*: presence of lymphocyte infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT).

Lesions suggestive of IAV: suppurative necrotizing or proliferative bronchiolitis/bronchitis associated or not with bronchiointerstitial pneumonia, and bronchiolitis obliterans and fibrous tissue.

Control group: lungs without pulmonary consolidations. Mild group: with apical and/or cardiac lobes consolidation. Severe group: lungs with disseminated consolidation lesion.

**Table 2** - *M. hyopneumoniae* and IAV occurrence of microscopic lesions suggestive of both agents in finishing pigs according to the barn.

Microscopic lesion	Barn		P-value
	A*	B*	
<i>M. hyopneumoniae</i>	65.5 ± 4.4 (76/116)	55.1 ± 4.2 (76/138)	0.09
IAV	64.7 ± 4.4 (75/116)	68.8 ± 3.9 (95/138)	0.48
<i>M. hyopneumoniae</i> + IAV	47.4 ± 4.5 (55/116)	42.7 ± 4.4 (59/138)	0.45

\*Barn A: manual curtain management. Barn B: automatic curtain management.

Mean ± SEM.

Lesions suggestive of *M. hyopneumoniae*: presence of lymphocyte infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT).

Lesions suggestive of IAV: suppurative necrotizing or proliferative bronchiolitis/bronchitis associated or not with bronchiointerstitial pneumonia, and bronchiolitis obliterans and fibrous tissue.

### 3.3 Growth performance

The regression analysis showed that for each cough episode, there was a decrease of 10.5 g in ADG ( $P < 0.01$ ). Pigs with  $\geq 6$  cough counted (classes 4 and 5) had significantly lower ADG ( $1.02 \pm 0.01$  and  $0.98 \pm 0.02$  kg/d, respectively) when compared to the pigs which not presented cough during the trial (Class 0;  $1.09 \pm 0.01$  kg/d) ( $P < 0.01$ ). Classes 1, 2 and 3 ( $1.09 \pm 0.01$ ,  $1.06 \pm 0.01$  and  $1.05 \pm 0.01$  kg/d, respectively) did not differ from Class 0 ( $P > 0.15$ ). There was no difference in pig deaths + removal rate between the barns ( $1.5 \pm 0.4$  vs.  $2.3 \pm 0.6$ , in barn A and B, respectively,  $P = 0.3$ ).

## 4. Discussion

In this study, we aimed to investigate the relationship among coughing count, environmental conditions, and the presence of two primary pathogens of pneumonia in pigs. In several studies, the coughing has been used as a practical tool for respiratory disease identification in pigs (NATHUES *et al.*, 2012; LUEHRS *et al.* 2017; BARALDI *et al.*, 2019; RYT-HANSEN *et al.*, 2019; PESSOA *et al.*, 2021). However, some gaps still exist, mainly regarding coughing patterns. In our study, we observed that the coughing count was higher in the morning than in the afternoon shift. This difference between shifts could have occurred due to the accumulation of gases, particulate matter, and poor air circulation during the night, when the barn curtains are closed. The interaction between barn and shift revealed that barn B presented a higher  $\text{NH}_3$  concentration in the morning shift than barn A. Due an automatic system only based on internal temperature, barn B remained more time with curtain closed than barn A. Thus, we hypothesize that poor air circulation resulted in bad environment conditions and increased coughing count. It is known that with poor air circulation there is an increase in the particulate matter, resulting in higher odds for pneumonic lesions, higher lung lesions severity, higher odds of pleurisy lesions, and a higher number of *M. hyopneumoniae* PCR positive results (MICHELS *et al.*, 2015).

The higher relative humidity in the morning than in the afternoon shift, could have occurred by the low temperature inside the barn usually, present in the morning shift, also resulting in a higher humidity, as described by Seedorf *et al.* (1998). The recommended relative humidity for pigs is between 60 – 70%, and a high relative humidity could represent a greater risk of respiratory infections (SEEDORF *et al.*, 1998; STÄRK, 2000), due to impaired



mucus transit (by making it excessively fluid), which could have contributed to the higher coughing count in this shift.

It is known that the increased  $\text{NH}_3$  concentration predisposes the respiratory tract to infections due to the impact on the function of the mucosal clearance system (MAES *et al.*, 2008; MICHIELS *et al.*, 2015), which may result in coughing pigs. As the week of housing increased, it was found an increase of  $\text{NH}_3$  concentration and coughing count. This is consistent with the findings of Pessoa *et al.* (2021), who reported higher levels of coughing at the end of the finishing period, impacting in the lung lesions at slaughter. Baraldi *et al.* (2019) observed a progressive increase in the percentage of *M. hyopneumoniae* seropositivity, reaching the highest proportion in slaughtered pigs (80%) compared to the growing and finishing phases (43.7 and 69.8%, respectively). Thus, these findings demonstrate the impact of advanced animals age on the infection dynamics of this agent which may also be associated with the increase in coughing count in this period.

Previous studies suggested that the limited ventilation flow during cold months could increase  $\text{NH}_3$  concentration (O'SHAUGHNESSY *et al.*, 2002; CHANTZIARAS *et al.*, 2020). In fact, our study was carried out in the coldest months of the year, leading to closed curtains for longer period. This was more evident in barn B, since the automatic curtains were temperature-regulated, resulting in greater  $\text{NH}_3$  concentration levels and higher coughing counting when compared with barn A (manual curtains). The limits established for  $\text{NH}_3$  concentration for swine production is 11 ppm, measured at the height of a finishing pig (DONHAM, 1990). In this study, we measured the environmental  $\text{NH}_3$  concentration at approximately 1.0 m and we observed that the  $\text{NH}_3$  concentration tends to be lower than at the height of a finishing pig, probably due to the dissipation of gas into the environment. This means that the limit for  $\text{NH}_3$  concentration should be lower at 1.0 m height. In this study the maximum values were up to 11 ppm, suggesting that the levels were too high in both barns if the sensors were placed at an adult pig height.

$\text{CO}_2$  concentration is a poorly investigated variable and more studies are needed to define a limit for its concentration in pig facilities. Although a poor correlation was found between  $\text{CO}_2$  and coughing count, environmental  $\text{CO}_2$  concentration is an useful tool to calculate ventilation rates in livestock buildings. The higher  $\text{CO}_2$  concentration observed in barn B reinforces the limited ventilation flow in this barn.  $\text{NH}_3$  and  $\text{CO}_2$  were positively correlated ( $r = 0.24$ ;  $P < 0.001$ ) in the present study.  $\text{CO}_2$  is originated by animal respiration, but also from manure, where the  $\text{NH}_3$  formation releases  $\text{CO}_2$ , or through anaerobic

fermentation (liquid manure) and aerobic degradation (solid manure) of organic matter (PHILIPPE & NICKS, 2015). Chantziaras *et al.* (2020) observed that CO<sub>2</sub> concentrations increased during the autumn and winter and declined during spring and summer periods. Furthermore, they found higher CO<sub>2</sub> levels in the naturally-ventilated unit (1772 ppm) compared to the mechanically-ventilated unit (negative pressure; 1238 ppm), due to of the flow ventilation.

It is important to note that at 40 days of housing (corresponding to first week of trial) and at 90 days of housing (corresponding to seventh week of trial), Tiamulin 80% and Florfenicol 40%, respectively, were administrated in feed, which seemed to have controlled the coughing. However, two weeks prior to slaughter Florfenicol 10% was administrated in feed and did not control the occurrence of coughing. Tiamulin is commonly used for the treatment of respiratory infections caused by *A. pleuropneumoniae* and *M. hyopneumoniae*, and studies demonstrated that this antimicrobial is one of the most *in vitro* active with Minimal Inhibitory Concentration values consistently low (GAUTIER-BOUCHARDON, 2020). Additionally, Florfenicol in feed has already been described to be effective in decreasing the clinical effects of *M. hyopneumoniae* infection (CIPRIÁN *et al.*, 2012). However, even with the use of antimicrobials, the coughing count continued to increase over the weeks, which can be explained by the impaired environment conditions with the NH<sub>3</sub> increase and the possible *M. hyopneumoniae* spread at the end of the finishing phase.

The coughing count is an useful tool for pig health monitoring. However, the different patterns among pens (sampling points) showed that several samples must be collected to be representative. The points with more coughing counts were at barn extremes. Silva *et al.* (2008) found the same pattern and associated to the higher temperature difference of the airflow at those locations, due to the higher ventilation through the windows. Moreover, Pessoa *et al.* (2021) also observed pen-specificity for coughing, but due to the slow transmission of *M. hyopneumoniae* between pigs and along the pens. In our study, both factors, i.e. *M. hyopneumoniae* transmission and airflow could differently affect sampling points, since early increase in coughing counts was observed in point 1 and 5.

A total of 90.0% of the *in vivo* sampled pigs and 85.0% of the lung samples were *M. hyopneumoniae* positive by PCR. Moreover, 59.8 % of the lungs showed BALT hyperplasia suggestive of *M. hyopneumoniae* infection. These results are similar to those found by other researchers in Brazilian finishing pigs, reinforcing the high presence of the agent in swine production (TAKEUTI *et al.*, 2013; MORÉS *et al.*, 2015; DE CONTI *et al.*, 2021). The *M.*

*hyopneumoniae* prevalence difference of 25.2% found between PCR and histopathological results has already been reported and could be associated with a recent or mild infection with not enough time to cause microscopic lesions, such as BALT hyperplasia (DE CONTI *et al.*, 2021).

Although the IAV has been associated to nursery pigs, due to the decrease of maternal immunity and the increase of infection susceptibility at this age (VAN REETH & VICENT, 2019), it has been recently reported high prevalence in finishing pigs. In the present study, only 1.7 % of the *in vivo* sampled coughing pigs and 1.2 % of the lung samples were IAV positive by PCR; however, 66.9% of the lungs showed lesions suggestive of IAV infection (suppurative necrotizing or proliferative bronchiolitis/bronchitis associated or not with bronchointerstitial pneumonia, and bronchiolitis obliterans and fibrous tissue). The high prevalence of microscopic suggestive lesions of IAV was also observed in slaughtered pigs by De Conti *et al.* (2021), with a prevalence of 64.6%. Thus, these results, highlight the importance of this virus infection also in finishing pigs. The difference in positivity between the IAV diagnostic methods is known. The IAV infection has a fast resolution, with convalescence around seven days after infection (SCHAEFER *et al.*, 2013) and the detection has been reported to be possible for no more than 11 days post-infection by real-time PCR (LANGE *et al.*, 2009). Additionally, IAV is an RNA virus that has low stability outside the host, which makes its detection difficult, resulting in false negatives. Furthermore, the histopathologic lesions resolution occurs within three weeks after infection (JANKE, 2000), which means that the microscopic lesions suggestive of IAV in our study probably occurred during the finishing phase. It is important to mention that we performed the coughing count twice a day, daily, demonstrating that coughing is not an effective method to identify the onset of IAV infection.

We also observed that lungs with microscopic lesions suggestive of *M. hyopneumoniae* associated with IAV presented higher severity of macroscopic lesions. Supporting our findings, it has been observed that pigs infected by both *M. hyopneumoniae* and IAV have a more severe initial pneumonic condition and present a higher coughing count than animals infected with single agent (THACKER; THACKER; JANKE, 2001). More recently it was observed that the infection with *M. hyopneumoniae* prior to IAV inoculation increased Influenza clinical signs, *M. hyopneumoniae*, and IAV H1N1 appeared to act synergistically; whereas *M. hyopneumoniae* and IAV H1N2 would compete, as H1N2 infection led to the elimination of *M. hyopneumoniae* in lung diaphragmatic lobes

(DEBLANC *et al.*, 2012). Mechanisms responsible for the increased severity of clinical disease in case of dual infection are still not clear. However, Deblanc *et al.* (2013) observed that the severity of flu syndrome and reduction in animal performance may vary depending on the level of oxidative stress caused by *M. hyopneumoniae* at the moment of the IAV infection. More studies are necessary to understand the mechanism of synergism between those agents, since the economic impact of this association has been estimated to be 16 times greater than single infections caused only by *M. hyopneumoniae* (HADEN *et al.*, 2012).

It was observed a similar prevalence of PCR detection for *M. hyopneumoniae in vivo* and in lungs samples between barn A (manual curtain) and B (temperature-regulated automatic curtains). Likewise, suggestive microscopic lesions for *M. hyopneumoniae* and IAV prevalence were similar between barns, suggesting similar challenges in relation to the agents studied. On the other hand, the barn A, which presented a lower coughing counting, had more extensive pulmonary lesions. It is important to mention that barn B had an earlier clinical presentation than barn A, and lung lesions associated with respiratory disease in younger animals may heal, leaving no scar tissue (PAGOT; POMMIER; KEÏTA, 2007). In addition, we hypothesize that barn B had worse environmental conditions and the coughing could be more related to impaired environment than with the effect of infectious agents.

Our results indicated that for each coughing episode, there was a decrease of 10.5 g in ADG. Moreover, we observed that pigs presenting 6 or more coughs, had a lower ADG when compared to the class of animals without coughing during the study, demonstrating the effect of coughing on the pigs performance. Although the coughing effect on pigs performance had not been studied yet, it is already known that pigs infected with *M. hyopneumoniae* has a decrease in the feed intake and reduced growth rate, worsened feed conversion, and lower carcass quality (REGULA *et al.* 2000; MAES *et al.*, 2018). Decreased performance could also be explained by the *M. hyopneumoniae* effects in the immune modulation, inducing the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1, TNF-a, and IL-6, and plasmin, recognized as central to the regulation of inflammatory responses (WOOLLEY *et al.*, 2013).

We observed similar results in lung lesions extension and *M. hyopneumoniae* detection by PCR between pigs with or without coughing episodes during the assessments, demonstrating that cough is a clinical sign which might not be directly related to *M. hyopneumoniae* infection or presence of lung lesions at slaughter. However, Pessoa *et al.* (2021) found a positive correlation between lung lesions, respiratory distress index and coughing count at the end of finisher period (weeks 21 – 24 of the pigs age). Their study

suggests that cough at the end of finishing phase is indicative of lung injury. Our results are from a positive farm and we exclusively considered the effects of *M. hyopneumoniae* and IAV infection, while Pessoa *et al.* (2021) results are based on a positive farm for *M. hyopneumoniae*, IAV, PRRS and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, which can change the pigs cough patterns, as well as the lesions found in the slaughterhouse. Furthermore, coughing is a body physiological response to external aggressions, depending on the environment and infectious challenges specific for each building. Based on these differences the coughing patterns and its effects on lung health may change. Therefore, studies that seek to investigate other factors could help to control coughing and improve the pig respiratory health.

## 5. Conclusions

The results showed that as the pig grow at the finishing phase, an impairment in environmental conditions occurs, increasing the coughing count. In addition, more than 6 episodes of coughing during the assessment compromised the animal weight gain. We found in this study that coughing was not directly associated to *M. hyopneumoniae* or IAV infections or presence of lung lesions at slaughter. Thus, improvement in environmental conditions is essential to assure respiratory health in finishing pigs.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Master Agroindustrial (Videira, Santa Catarina, Brazil) and Boehringer Ingelheim Animal Health for their partnership. This study was financed in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

ALLEN, T. C. Hematoxylin and eosin. In: PROPHET, E. B. *et al.* (org.). **Laboratory Methods in Histotechnology**. 1<sup>a</sup>ed. Washington, D.C.: American Registry of Pathology, 1992. p. 53–58.

BARALDI, T. G. *et al.* Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and influenza virus and their relationships with risk factors, clinical signs and lung lesions in pig farms with one-site production systems in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 171, p. 104748, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104748>.

BLANCHARD, B. *et al.* Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 30,

n. 4, p. 329–341, 1992. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90020-T](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90020-T).

CHANTZIARAS, I. *et al.* Environment-, health-, performance- and welfare-related parameters in pig barns with natural and mechanical ventilation. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 183, p. 105150, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2020.105150>

CHRISTENSEN, G.; SORENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. *In*: STRAW, B. E. *et al.* (org.). **Diseases of Swine**. 1<sup>a</sup>ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 913–940.

CIACCI-ZANELLA, J. R. *et al.* Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 180, n. 1–2, p. 118–122, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.021>

CIPRIÁN, A. *et al.* Florfenicol feed supplemented decrease the clinical effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in swine in México. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 191–196, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2011.01.010>

DE CONTI, E. R. *et al.* Agents of pneumonia in slaughtered pigs in southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, [s. l.], v. 41, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6669>

DEBLANC, C. *et al.* Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 162, n. 2–4, p. 643–651, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.028>.

DEBLANC, C. *et al.* Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 157, n. 1–2, p. 96–105, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.027>.

DONAVAN, T. S. The role of influenza on growing pig performance. *In*: , 2005. **Proceedings of the Allen D. Lemman Swine Conference**. [S. l.: s. n.], 2005. p. 97–98.

DONHAM, K. J. Health effects from work in swine confinement buildings. **American Journal of Industrial Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 17–25, 1990. Available at: <https://doi.org/10.1002/ajim.4700170105>.

FERRAZ, M. E. S. *et al.* Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 182, n. July, p. 105091, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105091>.

GARRIDO-MANTILLA, J. *et al.* Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 61, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1805-0>

- GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. Chapter 10: Antimicrobial treatment of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. In: MYCOPLASMAS IN SWINE. [S. l.: s. n.], 2020. p. 181–205.
- HADEN, C. *et al.* Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. In: , 2012. **Proceedings of the 2012 American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting**. [S. l.: s. n.], 2012. p. 75–76.
- JANKE, B. H. Diagnosis of swine influenza. **Swine Health and Production**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 79–84, 2000.
- LANGE, E. *et al.* Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 90, n. 9, p. 2119–2123, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1099/vir.0.014480-0>.
- LUEHRS, A. *et al.* Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. **Veterinary microbiology**, [s. l.], v. 203, p. 1–5, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2017.02.001>.
- MADEC, F.; KOBISCH, M. Bilan lésionnel des poumons de pores charcutiers à l'abattoir. **Journées Recherche Porcine**, [s. l.], v. 14, p. 405–412, 1982.
- MAES, D. *et al.* Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 297, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.09.008>.
- MAES, D. *et al.* Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. **Transbound Emerg Dis**, [s. l.], v. 65, p. 110–124, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1111/tbed.12677>
- MERIALDI, G. *et al.* Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 234–239, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2011.11.009>
- MICHIELS, A. *et al.* Impact of particulate matter and ammonia on average daily weight gain, mortality and lung lesions in pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 121, n. 1–2, p. 99–107, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.011>
- MORÉS, M. A. Z. *et al.* Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 725–733, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2015000800004>
- NATHUES, H. *et al.* Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. **Veterinary journal**, [s. l.], v. 193, n. 2, p. 443–447, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2012.01.013>.
- NI, J.-Q. *et al.* Methane and Carbon Dioxide Emission from Two Pig Finishing Barns. **Journal of Environmental Quality**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 2001–2011, 2008. Available at: <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0386>.

O' SHAUGHNESSY, P. T.; ACHUTAN, C.; KARSTEN, A. W. Temporal Variation of Indoor Air Quality in an Enclosed Swine Confinement Building. **Journal of Agricultural Safety and Health**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 349–364, 2002. Available at: <https://doi.org/10.13031/2013.10217>.

PAGOT, E.; POMMIER, P.; KEÏTA, A. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. **Revue de Medecine Veterinaire**, [s. l.], v. 158, n. 5, p. 253–259, 2007.

PESSOA, J. *et al.* Managing respiratory disease in finisher pigs: Combining quantitative assessments of clinical signs and the prevalence of lung lesions at slaughter. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 186, p. 105208, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105208>

PHILIPPE, F. X.; NICKS, B. Review on greenhouse gas emissions from pig houses: Production of carbon dioxide, methane and nitrous oxide by animals and manure. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v. 199, p. 10–25, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2014.08.015>

RECH, R. R. *et al.* Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. e155–e161, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1111/zph.12424>

REGULA, G. *et al.* Comparison of serologic testing and slaughter evaluation for assessing the effects of subclinical infection on growth in pigs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 217, n. 6, p. 888–895, 2000. Available at: <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.888>.

ROTOLO, M. L. *et al.* Sampling guidelines for oral fluid-based surveys of group-housed animals. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 209, p. 20–29, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2017.02.004>

RYT-HANSEN, P. *et al.* Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–10, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13567-019-0655-X/TABLES/7>.

SCHAEFER, R. *et al.* Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 61–73, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100012>.

SEEDORF, J. *et al.* Temperature and Moisture Conditions in Livestock Buildings in Northern Europe. **Journal of Agricultural Engineering Research**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 49–57, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1006/jaer.1997.0284>.

SIBILA, M. *et al.* Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 181, n. 3, p. 221–231, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.020>.



- SILVA, M. *et al.* Cough localization for the detection of respiratory diseases in pig houses. **Computers and Electronics in Agriculture**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 286–292, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.05.024>.
- SPONHEIM, A. *et al.* Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection. **Veterinary microbiology**, [s. l.], v. 241, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.108500>.
- STÄRK, K. D. C. Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine—A Literature Review. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 159, n. 1, p. 37–56, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1053/TVJL.1999.0421>.
- STOMBAUGH, D. P.; TEAGUE, H. S.; ROLLER, W. L. Effects of atmospheric ammonia on the pig. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 844–847, 1969. Available at: <https://doi.org/10.2527/JAS1969.286844X>.
- TAKEUTI, K. L. *et al.* Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 203, n. March, p. 215–220, 2017a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.025>.
- TAKEUTI, K. L. *et al.* Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 208, n. July, p. 18–24, 2017b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.007>.
- TAKEUTI, K. L. *et al.* Caracterização histopatológica e imuno-histoquímica da pneumonia causada pela co-infecção por *Pasteurella multocida* e *Mycoplasma hyopneumoniae* em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 1-6, 2013.
- THACKER, E. L.; THACKER, B. J.; JANKE, B. H. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 2525–2530, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2525-2530.2001>.
- VAN REETH, K.; VICENT, A. L. Influenza viruses. *In*: ZIMMERMAN, J. J. *et al.* (org.). **Diseases of Swine**. 11. ed. [S. l.]: Wiley, 2019. p. 576–593. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119350927>.
- VANGROENWEGHE, F. A. C. J.; THAS, O. Seasonal variation in prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and other respiratory pathogens in peri-weaned, post-weaned, and fattening pigs with clinical signs of respiratory diseases in belgian and dutch pig herds, using a tracheobronchial swab sampling. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1–14, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10091202>.
- WATANABE, T. T. N. *et al.* Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza A infection in Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 1148–1154, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100013>.
- WHO, W. H. O. CDC Protocol of Realtime RTPCR for Swine Influenza A(H1N1). *In*: , 2009, Geneva. **Anais [...]**. Geneva: World Health Organization, 2009.

WOOLLEY, L. K. *et al.* Plasmin activity in the porcine airways is enhanced during experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, is positively correlated with proinflammatory cytokine levels and is ameliorated by vaccination. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 164, n. 1–2, p. 60–66, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.003>.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a tosse seja uma resposta fisiológica do organismo capaz de indicar uma irritação ou inflamação do trato respiratório como um todo, constantemente ela é associada a pneumonias de origem infecciosa, como por exemplo, no caso de infecções por *M. hyopneumoniae*. Estudos já demonstraram que ela pode estar associada a agentes infecciosos, mas também a outros fatores. Neste estudo, buscamos encontrar algumas respostas sobre a tosse, seu comportamento, o impacto no desempenho dos animais e sua associação com agentes infecciosos e condições ambientais.

As altas concentrações de amônia indicam baixa renovação de ar e baixa qualidade ambiental no interior dos galpões, com o aumento de idade e peso dos animais a excreção de precursores da amônia aumentam. Esses fatores associados ao aumento da contagem de tosse nas últimas semanas de alojamento fazem com que esse período seja crítico para a saúde respiratória dos suínos. Somado a isso, observamos que a tosse possui a capacidade afetar o desempenho dos animais, e quanto mais episódios de tosse, mais esse desempenho é prejudicado.

Além disso, observamos que galpão com manejo de cortina automática, regulada apenas por sensores de temperatura, pode ter maior contagem de tosse e piores condições ambientais. Pelo fato do experimento ter sido realizado em meses mais frios do ano, as cortinas ficavam mais tempo fechadas à fim de manter a temperatura dentro da instalação o que resultava no acúmulo de gases e poeira, demonstrando que somente um parâmetro para a regulagem das cortinas não é o ideal, sendo necessários mais momentos para a acionamento dessas cortinas para renovação do ar das instalações.

Mesmo com a presença de *M. hyopneumoniae* no estudo nós não verificamos associação entre tosse e detecção deste agente nas amostras de pulmões, e entre tosse e lesões pulmonares macroscópicas. Estes achados demonstram que apesar da presença do agente ser um fator de risco para a sintomatologia clínica de tosse, a condição ambiental tem um papel importante em agravar o quadro clínico e a condição respiratória. Com isso, concluímos a

necessidade de estudos e manejos que busquem melhorar a qualidade ambiental dentro das instalações de suínos, principalmente na fase de terminação, considerada uma fase crítica.

## 5. REFERÊNCIAS

ARSENAKIS, I. *et al.* Efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination before and after weaning against experimental challenge infection in pigs. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 63 – 71, 2017.

ASAI, T. *et al.* Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 51, p. 325 – 331, 1996.

BARCELLOS, D. E. S. N., *et al.* Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 87-93, 2008.

BETLACH, A. M. *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: Current trends and proposed terminology for genomic classification. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 5, p. 1840–1854, 2019.

BEYTUT, E. Sheep pox virus induces proliferation of type II pneumocytes in the lungs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 132-141, 2010.

BOCHEV, I. Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): Review. Etiology, Epidemiology, Clinical Forms and Pathoanatomical Features. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 10, p. 131–146, 2007.

CARRAT F. *et al.* Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v. 25, p. 6852 – 6862, 2007.

CHANTZIARAS, I. *et al.* Environment, health, performance and welfare-related parameters in pig barns with natural and mechanical ventilation. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 183, p. 105150, 2020.

CHARLEY, B. *et al.* Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections. **New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 130–136, 2006.

CHEONG, Y. *et al.* Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 283–289, 2017.

DEL POZO SACRISTAN, R. *et al.* Efficacy of early *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination against mixed respiratory disease in older fattening pigs. **Veterinary Record**, v. 174, p. 197 – 208, 2014.

DIAZ, A. *et al.* Multiple Genome Constellations of Similar and Distinct Influenza A Viruses Co-Circulate in Pigs During Epidemic Events. **Nature**, v. 7, p. 11886, 2017.

DIAZ, A. *et al.* Association between influenza A virus infection and pigs subpopulations in

endemically infected breeding herds. **PLoS One**, v. 10, p. e0129213, 2015.

DONOVAN T. S. The role of influenza on growing pig performance. **In: *Proceedings of the Allen D. Lemans Swine Conference***, 97–98, 2005.

DUGAN, V. G. *et al.* The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. **PLoS Pathogens**, v.4, p. e1000076, 2008.

EVERETT H. E. *et al.* Vaccine-mediated protection of pigs against infection with pandemic H1N1 2009 swine influenza A virus requires a close antigenic match between the vaccine antigen and challenge virus. **Vaccine**, v. 17, p. 2288 – 2293, 2019.

FEHRENBACH, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. **Respiratory Research**, v.2, p. 33 – 46, 2000.

FERRAZ, M. E. S. *et al.* Lung consolidation caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* has a negative effect on productive performance and economic revenue in finishing pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 182, p. 105091, 2020.

FLORES, E. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Gráfica da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

FRÉDÉRIC, A. *et al.* Seasonal Variation in Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and Other Respiratory Pathogens in Peri-Weaned, Post-Weaned, and Fattening Pigs with Clinical Signs of Respiratory Diseases in Belgian and Dutch Pig Herds, Using a Tracheobronchial Swab Sampling Technique, and Their Associations with Local Weather Condition. **Pathogens**, v. 10, p. 1202 – 1216, 2021.

GARRIDO-MANTILLA, J. *et al.* Impact of nurse sows on influenza A virus transmission in pigs under field conditions. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 188, p. 105257, 2021.

GARRIDO-MANTILLA, J. *et al.* Comparison of individual, group and environmental sampling strategies to conduct influenza surveillance in pigs. **Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2019.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GARZA-MORENO, L. *et al.* Characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains in vaccinated and non-vaccinated pigs from Spanish slaughterhouses. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 18–23, 2019a.

GARZA-MORENO, L. *et al.* Comparison of vaccination protocols against *Mycoplasma hyopneumoniae* during the gilt acclimation period. **Veterinary Microbiology**, v. 229, p. 7–13, 2019b.

GARZA-MORENO, L. *et al.* Survey on *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt acclimation practices in Europe. **Porcine Health Management**, v. 3, p. 1–8, 2017.

GUEDES, R. M. C. Como monitorar infecções subclínicas causando perdas de desempenho na recria e terminação. **Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay**, v.48, p.49-51, 2012.

HAAC, V. *et al.* Influência das condições de armazenamento do vírus Influenza na detecção por RT-qPCR e isolamento viral. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1 – 9, 2018.

HADEN, C. *et al.* Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. **In: Proceedings of the 2012 American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting**. Perry, IA, p. 75–6, 2012.

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

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

HUSSELL, T. & BELL, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. **Nat Review of Immunology**, v. 14, p. 81–93, 2014.

ITO, T. *et al.* Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7367–7373, 1998.

JANKE, B. H *et al.* Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and diagnosis. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 96 – 102, 2013.

KAHN R. E. *et al.* Swine and Influenza: A Challenge to One Health Research. **In: Compans R., Oldstone M. Influenza Pathogenesis and Control - Volume I. Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 385, 2014.

KONING, H. E. & LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos – Texto e atlas colorido**. 6<sup>ed</sup>. Porto Alegre: Artmed, 2016.

LOWE, J. S. & STEVENS, S. **Histologia Humana**. 5 ed. Espanha: Elsevier, 2020.

LUEHRS, A. *et al.* Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. **Veterinary Microbiology**, v. 203, p. 1–5, 2017.

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

MARTELLI, P. *et al.* Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, p. 229 – 233, 2006.

MERIALDI, G. *et al.* Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with focus on the extent of the conditions and herd risk factors. **Veterinary Journal**, v. 193, p. 234–239, 2012.

MICHIELS, A. *et al.* Impact of particulate matter and ammonia on average daily weight gain, mortality and lung lesions in pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, p. 99 – 107, 2015.

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

NATHUES, H. *et al.* Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 2, p. 443–447, 2012.

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

NELSON, M. I. *et al.* Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1339–1347, 2015.

NETO, J. & LOWENTHAL, C. Incidência de pneumonia e rinite atrófica e suas consequências econômicas em suínos de abate, avaliados pelo método T.R.A.C. **IN: Anais IV ABRAVES**, Itapema, p. 65, 1989.

NI, J. *et al.* Methane and carbon dioxide emission from two pig finishing barns. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 2001–2011, 2008.

OPRIESSNIG, T., *et al.* Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 133–148, 2011.

PACCE, V. D. *et al.* Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in slaughter pigs from southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 1, p. 1–5, 2019.

PABST, R. *et al.* Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs: What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? **Immunology**, v. 1, p. 112 – 122, 2007.

PALLARÉS, F. J. *et al.* Lesiones y patógenos asociados al complejo respiratorio porcino. **Albéitar**, p. 34 – 36, 2019.

PESSOA, J. *et al.* Managing respiratory disease in finisher pigs: Combining quantitative assessments of clinical signs and the prevalence of lung lesions at slaughter. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 186, p. 105208, 2021.

PIETERS, M. *et al.* Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. **Veterinary Microbiology**, v.172, p.575 – 580, 2014.

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

PIFFER, I. Relação entre meio ambiente e doenças do sistema respiratório. **III Simpósio do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves**, Concórdia, p. 197-211, 1983

PIFFER, I. *et al.* Efeito das afecções pulmonares, observadas no abate, sobre o desenvolvimento dos suínos. **IN: Anais III ABRAVES**, Rio de Janeiro, p. 105-106, 1985.

RAHN J. *et al.* Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments. **Vaccine**, v. 33, p. 2414 – 2424, 2015.

RAJÃO, D. S *et al.* Serological evidence of swine influenza in Brazil. **Influenza Other Respiratory Viruses**, v. 7, p. 109 – 112, 2013.

RECH, R. R. *et al.* Porcine respiratory disease complex after the introduction of H1N1/2009 influenza virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. e155–e161, 2018.

RYT-HANSEN, P. *et al.* Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies. **Veterinary Research**, v. 50, 2019.

ROMAGOSA, A. *et al.* Transmission dynamics of a H1N1 swine influenza virus in a population previously infected with the 2009 pandemic H1N1 strain. **Proceedings of IPVS**, p. 266, 2010.

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

SCHAEFER, R. *et al.* Isolation and characterization of a Pandemic H1N1 Influenza Virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 761- 767, 2011.

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

SCHUBERT, R. W. & X. ZHANG. The equivalent Krogh Cylinder and axial oxygen transport, Oxygen Transport to Tissue. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 411, p. 191-202, 1997.

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

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

SOUZA, C. K. *et al.* Serological surveillance and factors associated with influenza A virus in backyard pigs in Southern Brazil. **Zoonoses Public Health**, p. 1 – 8, 2018.

SPONHEIM, A. *et al.* Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection. **Veterinary Microbiology**, v. 241, 2020.

STOMBAUGH, D. P. Effects of atmospheric ammonia on the pig. **Journal of Animal Science**, v. 96, p. 844–847, 1969.

STRAW, B. Studies on pneumonia, atrophic rhinitis, rate of gain, breed and their interactions in finishing pigs. **Journal American Medical Association**, v. 182, p. 607-611, 1983.

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

TAKEUTI, K. L. *et al.* Adaptação de leitões como ferramenta para redução do impacto da pneumonia enzoótica suína. In: **Bortolozzo, F.P.; Wentz, I.; Takeuti, K.L.; Mellagi, A.P.G.; Ulguim, R.R.; Barcellos, D.E. Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos III**. 3ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, p. 89 – 94, 2018.

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

THACKER E. L. & MINION F. C. 2012. Mycoplasmosis, p.779-797. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (Eds), **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames.

THACKER, E. L. *et al.* Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2525- 2530, 2001.

TREGONING, J. S. *et al.* Adjuvanted Influenza vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, p. - 550–564, 2018.

TRINDADE, F. *et al.* Métodos do Estudo do Transporte Mucociliar. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, p. 704-712, 2007.

TSHERING, T. & PABST, R. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) is not present in normal adult lung but in different diseases. **Pathobiology**, v. 68, p.110 – 122, 2000.

VINCENT, A. L. *et al.* Absence of 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in fresh pork. **Plos One**, v. 4, p. 8367 – 8376, 2009.

VINCENT, A. L. *et al.* Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. **Influenza Other Respiratory Viruses**, v. 4, p. 53–60, 2016.

VIOLA A *et al.* The metabolic signature of macrophage responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1462 – 1471.

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

YESKE, P. *et al.* Survival analysis of two *Mycoplasma hyopneumoniae* eradication methods. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 174, p. 104811, 2020.



ZANELLA, J. R. C. *et al.* Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 2016.

ZIMMERMAN, J. J. *et al.* **Diseases of Swine**. 11 ed. Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2019.