

LUIZ CARLOS BORDIN

**DETECÇÃO DO MYCOPLASMA SUIS EM GRANJAS COM TRANSTORNOS
REPRODUTIVOS**

LAGES- SC

2012

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUIZ CARLOS BORDIN

**DETECÇÃO DO MYCOPLASMA SUIIS EM GRANJAS COM TRANSTORNOS
REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Eliana Knackfuss Vaz

LAGES- SC

2012

LUIZ CARLOS BORDIN

**DETECÇÃO DO MYCOPLASMA SUIIS EM GRANJAS COM TRANSTORNOS
REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador(a) : _____
Professora Dr^a. Eliana Knackfuss Vaz, Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: _____
Dr. Paulo Augusto Esteves
Embrapa Suínos e Aves

Membro: _____
Dr^a. Danielle Gava
Embrapa Suínos e Aves

Membro: _____
Dr. Ubirajara Maciel da Costa
CAV- UDESC

Dedico este trabalho à minha família, em
especial à minha esposa Fabiola e à
minha filha Angelina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que chamarei aqui de GRANDE ESPÍRITO e que está onipresente em todas as manifestações da natureza. Por me dar a força vital e os ensinamentos divinos. Ahow.

Com muita sinceridade e carinho gostaria de manifestar meus agradecimentos em especial:

Às minhas orientadoras, Dra. Eliana Knackfuss Vaz e Dra. Sandra Ferraz, pela maneira tranquila e simples com que me conduziram, pela paciência e apoio.

Ao meu conselheiro acadêmico, grande pesquisador Nelson Morés, pelas suas sempre oportunas observações e conselhos.

Aos pesquisadores, Dr. Paulo Augusto Esteves e Dra. Danielle Gava, pelo apoio acadêmico na área de conhecimento da pesquisa que, a princípio, para mim era desconhecida. Agradeço a paciência e carinho que tiveram comigo.

À bolsista e colega Camila Sá Rocha e à assistente dos laboratórios de sanidade animal da Embrapa Suínos e Aves, Neide Simon, por todo o apoio dado nas tarefas laboratoriais.

Às colegas Elena Souza de Lima, Camila Sá Rocha e Giseli Aparecida Ritterbusch que, juntamente com a pesquisadora Janice Zanella, disponibilizaram os materiais do projeto de Doenças da Reprodução.

À chefia Geral e Técnica da Embrapa Suínos e Aves pelo apoio e disponibilidade sempre que necessário.

Aos demais colegas do laboratório de sanidade animal da Embrapa suínos e Aves pelo auxílio em todos os momentos.

À minha esposa Fabiola, pelo apoio e estímulo, agradeço com todo meu amor.

À minha filha Angelina, que nasceu durante o curso, agradeço pela energia que sempre transmitiu.

À minha família e meus ancestrais. Em especial meu pai Lindolpho José Bordin (*in memoriam*) e minha mãe Égide Dallagnol por me trazerem a graça da vida.

Aos colegas de mestrado Luís Fernando, Diego e Daniel, pelo carinho e ajuda em todos os momentos, com ou sem jantar, com ou sem Bruce Lee.

À UDESC CAV e seus colaboradores por proporcionarem o meu aprendizado profissional.

"Ser normal é meta dos fracassados."
Carl Jung

RESUMO

A Eperitrozonose Suína (ES), causada pelo *Mycoplasma suis*, é uma doença infecciosa das hemácias e que causa uma série de transtornos, desde reprodutivos, como o nascimento de leitões fracos e natimortos, e produtivos, como a ocorrência de doença clínica, queda de desempenho, aumento na conversão alimentar e imunossupressão. Alguns casos ainda podem levar à morte por anemia. Nas granjas a enfermidade pode ser assintomática ou ainda causar febre, anemia, icterícia e inapetência. O controle da ES é realizado com as tetraciclinas, as quais hoje se encontram em uso restrito de acordo com a legislação européia. Atualmente o diagnóstico da ES é realizado pela suspeita clínica e/ou pela utilização de esfregaços sanguíneos que são pouco sensíveis e pouco específicos. O objetivo do presente trabalho foi realizar estudo da ocorrência da ES em granjas com transtornos reprodutivos com o uso das técnicas de PCR com controle interno (CIA) e de PCR quantitativo em Tempo Real. O local de execução foi a Embrapa Suínos e Aves de Concórdia, SC. Foram avaliadas 80 porcas e 230 fetos de necropsias realizadas em 27 granjas com problemas reprodutivos no estado de SC e PR. De cada porca foram coletados sangue e tecidos de dois leitões abortados, natimortos, inviáveis ou mumificados. Após a necropsia os tecidos foram armazenados em placa estéril a -70 °C para futura extração de DNA. Não foram detectados DNA do agente infeccioso no sangue das porcas, tampouco dos tecidos fetais analisados no PCR. O CIA desenvolvido foi amplificado em todas as reações. No PCR em Tempo Real houve 17% de porcas positivas e 40,74% das granjas tiveram ao menos uma porca reagente.

Palavras-chave: doenças reprodutivas, suínos, PCR, PCR em Tempo Real, eperitrozonose suína, *Mycoplasma suis*.

ABSTRACT

Swine Eperythrozoonosis, (ES) caused by *Mycoplasma suis*, is an infectious disease of the red blood cells and causing a variety of reproductive disorders, since, as the birth of weak piglets and stillborn, and productive as the occurrence of clinical disease, performance degradation, increase in feed conversion and immunosuppression. Some cases may even lead to death from anemia. In the farms, the disease can be asymptomatic or cause fever, anemia, jaundice and poor appetite. The ES control is accomplished with the use of tetracyclines, which are now restricted in use in accordance with European legislation. Currently, the diagnosis of ES is made by clinical suspicion and or by using blood smears that are less sensitive and less specific. The aim of this study was to evaluate de *Mycoplasma suis* presence through the use of a PCR with internal control (CIA) and a quantitative Real Time PCR in farms with reproductive disorders. The place of performance was Embrapa Swine and Poultry in Concordia, SC. The sample consisted of 80 sows and 230 fetal necropsies performed on 27 farms with reproductive disorders in the states of Santa Catarina and Paraná. Were collected from each sow blood and tissues of two piglets and they were aborted, stillborn, mummified or unfeasible. After necropsy tissues were stored in sterile plate at -70°C for future DNA extraction. Had no detectable DNA of the infectious agent in the blood of neither the sows nor the fetal tissues analyzed by PCR. The CIA developed was amplified in all reactions. Real-time PCR has detected *M. suis* in 17% of the sows and 40, 74% of farms had at least one positive sow.

Keywords: reproductive disorders, pigs, PCR, Real Time PCR, eperythrozoonosis, *Mycoplasma suis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Característica de um <i>Mycoplasma sp</i>	19
Figura 2 – Demonstração do <i>M. suis</i> invadindo as hemácias	22
Figura 3 – Comparação da visualização da fixação em Acridina Orange x Microscopia eletrônica de varredura	23
Figura 4 – Etapa da extração do DNA de sangue total das porcas.....	31
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Padronização do CIA.....	35
Figura 6 – Amostras de sangue das porcas testadas	38
Figura 7 – Sensibilidade da PCR	40
Figura 8 – Especificidade da TaqMan qPCR para <i>M. suis</i>	41
Figura 9 – Amostras de sangue de 80 fêmeas testadas por TaqMan qPCR para <i>M. suis</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências e posições de nucleotídeos dos primers da PCR para <i>Mycoplasma suis</i>	34
Tabela 2 – Avaliação da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de TaqMan qPCR para <i>M. suis</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIA: Controle interno de amplificação

dNTP: Deoxyribonucleotides Phosphate

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ES: Eperitroozoonose suína

g: Gramas

gLB: Gel Loading Buffer

HA: Hemaglutinação

HI: Haemagglutination Inhibition (Inibição da Hemaglutinação)

IHQ: Imunohistoquímica

LB: Meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani"

M. suis: *Mycoplasma suis*

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

Nº: Número

ng: Nanograma

nmol: Nanomol

pb: Pares de base

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pmol: Picomol

PRRS: Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína

rpm: Rotações por minuto

S: Synthesis

SPF: Specific Pathogens Free

TA: Temperatura ambiente

TBE: Tris Borate EDTA

TE: Tris EDTA

U: Unidade

USDA: United States Department of Agriculture

V: Volts

W: Watts

X: Vezes

%: Porcentagem

°C: Graus Célsius

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 <i>MYCOPLASMA SUIS</i>	18
1.2 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES	20
1.3 EPIDEMIOLOGIA	20
1.4 PATOGENIA	21
1.5 DIAGNÓSTICO	22
1.6 CONTROLE	24
CAPÍTULO II – ARTIGO	25
OCORRÊNCIA DA EPERITROZONOSE SUÍNA EM GRANJAS COM TRANSTORNOS REPRODUTIVOS	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO	29
2.1.1 Seleção das granjas	29
2.1.2 Colheita das amostras	30
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA	30
2.3 CONTROLES POSITIVOS	31
2.4 CLONAGEM DE DNA PLASMIDEAL	32
2.4.1 Clonagem de fragmentos amplificados	32
2.4.2 Extração do DNA plasmideal recombinante	32
2.4.3 Comprovação da eficiência da clonagem	33
2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL (PCR)	33
2.6 CONTROLE INTERNO (CIA)	35
2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	36
2.7.1 Construção dos primers e sonda e construção do plasmídeo	36

2.7.2 Otimização da qPCR.....	36
2.7.3 Sensibilidade da qPCR.....	37
2.7.4 Especificidade e reprodutibilidade da qPCR.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	37
3.1.1 Sensibilidade da PCR	37
3.1.2 Teste de amostras de campo.....	37
3.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	38
3.2.1 Otimização da qPCR	38
3.2.2 Sensibilidade da qPCR	39
3.2.3 Especificidade e reprodutibilidade da qPCR.....	39
3.2.4 Teste de amostras de campo.....	39
4 CONCLUSÃO	44
5 REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO III – PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO	53

INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira ocupa hoje a quarta posição na produção mundial de carne suína, com uma participação crescente nas exportações mundiais (USDA, 2010). Esta posição competitiva está diretamente relacionada ao sistema de produção que alcança índices zootécnicos de referência internacional. A moderna produção de suínos baseia-se na utilização de avançados métodos de manejo que estabelecem conforto e bem estar animal, em práticas reprodutivas que maximizam a produtividade da fêmea, na utilização de linhagens genéticas com comprovada capacidade de transformar grãos em carne e um rígido controle da saúde dos rebanhos.

A saúde dos rebanhos comerciais suínos no Brasil tem o desafio do controle efetivo de muitas doenças que impactam aos sistemas produtivos como a exemplo da Eperitrozonose suína (ES). A ocorrência de enfermidades gera prejuízos em função da mortalidade, do menor desempenho no desenvolvimento e o consequente atraso na entrega para abate, no aumento da conversão alimentar, nos gastos com medicamentos, instalações e mão de obra. Aquelas que envolvem a reprodução podem ser consideradas como uma das maiores causas de prejuízos ao setor. Estas podem ser divididas em enfermidades infecciosas e são responsáveis por aproximadamente 30% a 40% dos transtornos reprodutivos. Neste grupo se inclui a parvovirose suína, a leptospirose, a síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), a toxoplasmose, a brucelose entre tantas outras causas de origem viral, bacteriana e micótica. Por outro lado, causas não infecciosas como as ambientais, as afecções do aparelho locomotor e os fatores estressantes são a principal ordem de causas de abortamentos (MORÉS *et al*, 2011).

A dinâmica de infecções nos plantéis muda ao longo do tempo, oportunizando doenças menos prevalentes a emergirem. Alterações ambientais podem dar chances à prevalência de um determinado agente infeccioso. A restrição de promotores de crescimento e ou a proibição de determinadas moléculas no controle de resíduos de antimicrobianos pode influenciar esta ocorrência de doenças, uma vez que alguns agentes, como no caso do *M. suis* é controlado com o uso das tetraciclina. Assim, a ES pode rapidamente se tornar uma enfermidade emergente e causar prejuízos importantes ao setor produtivo, além de surpreender os

laboratórios brasileiros que não possuem as ferramentas adequadas para diagnóstico. Para tal, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença do *M. suis* em fêmeas com patologias reprodutivas e em tecidos dos fetos oriundos destas, utilizando PCR e PCR quantitativo em Tempo Real.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MYCOPLASMA SUIS

A ES é uma doença infecto contagiosa hemotrópica dos suínos que afeta qualquer classe e idade em especial quando estes são submetidos a fatores estressantes (MATOS, 2007). A enfermidade foi descrita pela primeira vez na Alemanha (MAYER, 1921). Devido a algumas características biológicas deste agente, como a fixação Gram-negativa e sua transmissão estar ligada a artrópodes e contato com sangue, levaram a ser classificada na família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (MOULDER, 1974). No final da década de 90, após ser realizada o sequenciamento genético do gene ribossomal RNA (rRNA) 16s, o *Eperythrozoon suis* e outros agentes como *Eperythrozoon wenyonii*, *Haemobartonella muris* e *Haemobartonella felis* foram filogeneticamente analisados (NEIMARK; OGAN, 1997; RIKIHISA *et al.*, 1997) e mostraram homologia com o gênero *Mycoplasma* da família *Mycoplasmataceae* e da classe *Mollicute*. Os micoplasmas são agentes com ausência de parede celular e com genoma pequeno, são estritamente dependentes do hospedeiro e alguns não crescem em meio de cultivo. Aqueles que têm tropismo pelas hemácias são denominados hemoplasmas e podem variar em diâmetro desde 0.3 a 1 µm com forma de cocóide, anéis ou bacilar (MESSICK *et al.*, 2004).

Os micoplasmas são (Figura 1) procariontes pertencentes à Divisão Tenericutes e à Classe dos Mollicutes (do latim, *molli*, suave; *cutes*, cútis ou derme), nome de cuja origem se deve à característica peculiar da total ausência de parede e da molécula de peptidoglicano, sendo o seu citoplasma envolvido somente por uma membrana trilaminar. A Classe Mollicutes possui um nível taxonômico equivalente às eubactérias Gram positivas e Gram negativas e às arqueobactérias, que compreendem quatro divisões do Reino Procariota. Uma vez que não possuem parede celular, esses organismos demonstram ser negativos à coloração clássica de Gram. Os micoplasmas são considerados os menores microrganismos de vida livre capazes de auto-replicação, com dimensões médias variando de 0,2 a 0,4 µm de diâmetro; os espiroplasmas apresentam forma filamentosa, possuem de 0,08 a 0,2 µm de diâmetro e 2 a 5 µm de comprimento. Em função destas dimensões, estes

organismos passam através de poros de membranas filtrantes com diâmetros de até 0,45 μm . A ausência da parede celular determina características consideradas peculiares, tais como um acentuado pleomorfismo. O seu formato pode variar de esférico, bacilar, filamentoso e helicoidal, como por exemplo os espiroplasmas que podem atingir 100 μm de comprimento (WHITHEAR; BROWNING,2004) . O genoma do *M. suis* consiste de cromossomo circular simples de 742,431 pb e com conteúdo de 31,1mol% de G-C (GUIMARÃES *et al.*, 2011).

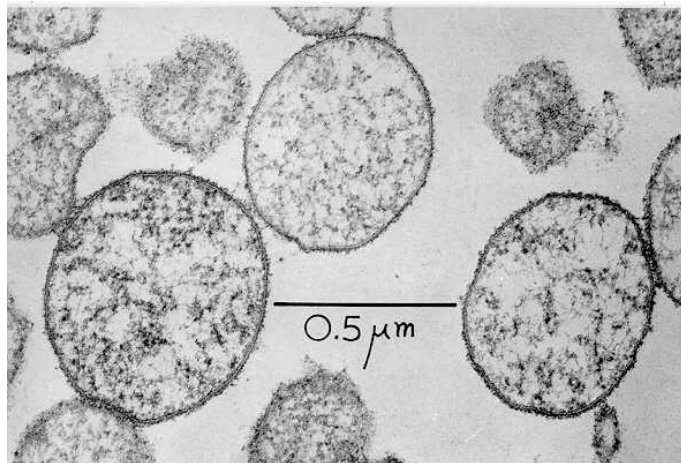


Figura 1 – Característica de um *Mycoplasma sp.*

Fonte: <http://www.webenfermedades.com/microorganismos-los-micoplasmas>.

Em 2001, Neimark *et al.* publicaram uma proposta oficial para a mudança na classificação dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* para o gênero *Mycoplasma*. Estas características fenotípicas e filogenéticas demonstraram especial relação com o grupo *pneumoniae* dos micoplasmas (TASKER *et al.*, 2003). Atualmente, a completa análise do genoma do *M. suis* foi publicada, sendo estabelecidas algumas possíveis vias metabólicas do agente (GUIMARÃES *et al.*, 2011a; OEHLERKING *et al.*, 2011) . Micoplasmas hemotrópicos costumam ser espécie específicos, porém há registros de humanos infectados pelos mesmos (YANG, 2000; SANTOS *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2009). As hemoplasmoses dos animais são variáveis sob o ponto de vista de severidade e podem ocorrer desde infecções crônicas sem sinais clínicos até quadros com anemia hemolítica aguda com presença de anorexia, febre, icterícia e hipoglicemia de acordo com as espécies envolvidas (BIONDO, 2009). A utilização de antimicrobianos como aditivos na alimentação dos suínos podem levar a ocorrência de casos crônicos ou subclínicos, em que os sinais clínicos não são característicos (HOELZLE, 2008).

1.2 SINAIS CLÍNICOS E LESÕES

As primeiras descrições dos sinais clínicos e lesões da EP foram feitas por Kinsley (1932) e a caracterizavam como uma icterooanemia com sinais de icterícia, sangue fluidificado, hemorragia nos pulmões, coração e rins, esplenomegalia e fígado aumentado com coloração amarelada ou descorado. A doença aguda é caracterizada por anemia hemolítica que pode ser letal e ocorre preferencialmente em suínos em terminação ou ainda em leitões lactantes, em crescimento e em porcas (ZACHARY, 1985). Em leitões lactantes observa-se palidez e icterícia com desidratação, ganho de peso inadequado e predisposição a ocorrência de outras infecções. Já em leitões de creche e crescimento além destes sinais, se observa febre que pode ultrapassar os 42 °C (HEINRITZI, 1990). Os leitões acometidos na forma aguda tendem a se tornar hipoglicêmicos e entram em coma seguido de óbito (MESSICK, 2004). Uma variedade de sinais clínicos pode estar presente e ser observado, como: dispnéia, enterite, fezes com coloração biliar, cianose e necrose de borda de orelhas (HEINRITZI, 1990). Em porcas comumente ocorre febre alta e anorexia imediatamente ou de um a três dias após transferência para a maternidade levando, normalmente, a menor produção de leite e comportamento materno alterado (THACKER, 2006). O mesmo autor relata que a infecção crônica em porcas pode levar a anestro, atraso no cio, morte embrionária precoce e abortamento e lesões de pele como hipersensibilidade com formação de urticárias. Brownback, (1981) descreveu as características dos efeitos reprodutivos causados pela ES. Zinn *et al.* (1983) não observaram impactos reprodutivos em porcas, porém leitões desmamados de porcas com altos títulos na prova da Inibição da hemoaglutinação tinham menor desenvolvimento. A susceptibilidade individual, relacionada à resposta imune, pode ainda interferir nos aspectos clínicos (MESSICK, 2004). As síndromes relacionadas à ES crônica podem estar envolvidas com maiores perdas econômicas (HOELZLE, 2008).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A ES tem ocorrência relatada em vários países produtores de suínos como no Brasil, EUA, Alemanha, China, África do Sul, Hungria, República Tcheca, entre

outros (SMOLA *et al.*, 2008). A taxa de prevalência real é de difícil obtenção devido à dificuldade de diagnóstico desta bactéria incultivável (HOELZLE, 2009). No Brasil alguns estudos, na tentativa do diagnóstico, obtiveram resultados conflitantes devido, possivelmente, ao método diagnóstico. Sobestiansky *et al.* (1990; 1999) relata a ocorrência no Brasil somente com diagnóstico clínico e não encontrou resultados conclusivos em esfregaços sanguíneos como diagnóstico diferencial de doenças respiratórias. Kuchiishi *et al.*(2001) também não encontrou resultados positivos em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa em 1400 amostras de sangue de animais abatidos colhidos em 14 semanas num frigorífico do estado de Santa Catarina. Guimarães *et al.* (2007) estudou a ocorrência em quatro rebanhos comerciais na região Sul e a prevalência média foi de 33,1 % com a técnica de PCR em tempo real confirmada com Southern Blot. Estudos na China já demonstraram a infecção pelo *M. suis* em humanos (YUAN, 2009). A transmissão experimental da ES foi confirmada pelas vias intravenosa, inoculação oral, subcutânea e intraperitoneal enquanto que a infecção natural foi demonstrada pela utilização de material contaminado como instrumentos cirúrgicos e agulhas (HENRY, 1979). Os ectoparasitas, como o piolho *Haematopinus suis*, têm sido atribuído à transmissão por picadas (Messick, 2004). Também, segundo Matos *et al.*(2007) se atribui a transmissão a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e ao ácaro da sarna suína (*Sarcoptes scabiei* var. *suis*). A infecção já foi demonstrada em javalis (HOELZLE, 2009a).

1.4 PATOGENIA

A principal ação do *M. suis* é causar icterooanemia aguda em suínos onde se observa altas contagens do mesmo no sangue confirmado por exames de PCR (HOELZLE, 2008). Historicamente, o mecanismo da patogenicidade do *M. suis* seria a característica ligação dos agentes hemoparasitas com a superfície da hemácia do hospedeiro onde a bactéria causaria alteração e consequente lise da mesma (ZACHARY *et al.*, 1985). Groebel *et al.*(2009) observou que baixa contagem de MS era notada entre hemácias ou em sua superfície, enquanto que altas contagens eram evidenciadas no PCR quantitativo. Assim comprovou-se que existe a invasão do micoplasma no interior do hemácia (Figura 2), como ocorre com o *Mycoplasma*

gallisepticum em aves, para este se servir do ferro encontrado em abundância neste sítio na forma de hemina (VOGL, 2008). A invasão dos hemácias possibilita a evasão do sistema imune, redução da eficácia dos antibióticos além dos benefícios nutricionais (GROEBEL *et al.*, 2009). Anemia hemolítica autoimune pode ocorrer e é uma forma onde ocorre destruição das hemácias mediada por auto-anticorpos fixados a antígenos da membrana eritrocitária, como a actina (FELDER, 2010). Estas possibilidades de invasão de hemácias podem explicar a tendência à cronicidade dos micoplasmas hemotrópicos (MESSICK, 2004). A cronicidade por sua vez pode resultar em ocorrências de desordens reprodutivas, ineficiência na conversão alimentar, e aumento na susceptibilidade a infecções secundárias como as respiratórias e entéricas. Por sua vez é esta a forma de maior importância econômica (HOELZLE, 2007a). Coagulação intravascular disseminada foi observada em animais esplenectomizados e infectados experimentalmente após ocorrer hemorragias espontâneas (PLANK; HEINRITZ, 1990).

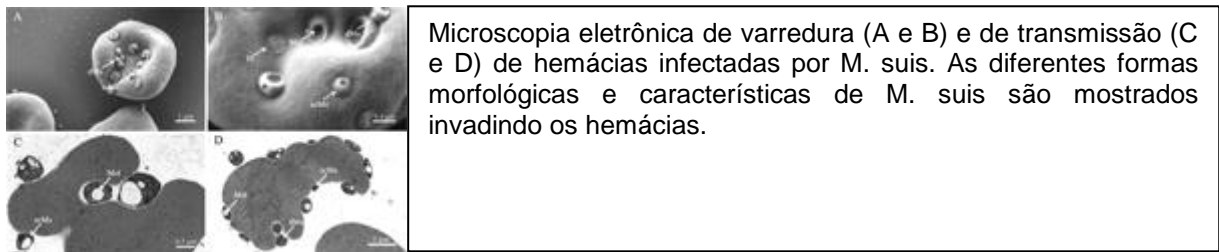


Figura 2 – Demonstração do *M. suis* invadindo os hemácias
 Fonte: (GROEBEL *et al.*, 2009).

1.5 DIAGNÓSTICO

A falta de crescimento *in vitro* é uma grande dificuldade enfrentada para diagnóstico de casos de suspeita de ES em casos de campo (HOELZLE, 2008). O diagnóstico sempre se baseou na detecção microscópica em esfregaços sanguíneos em coloração de Giemsa para observação do *M. suis*, porém este método é pouco sensível e pouco específico (HOELZLE *et al.*, 2007b).

A técnica Acridina Orange (Figura 3) é outro meio de coloração com o intuito de observação de material genético em células intactas (DNA ou RNA), mas ainda pouco sensível e específico (DARZYNKIEWICZ, 1990). Atualmente não se dispõem de um método que possibilite ensaios de rotina embora a literatura cite a Fixação de

Complemento e ELISA (SCHULLER *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 2008) ou a Hemaglutinação Indireta (SMITH; RAHN, 1975). Estas ferramentas de diagnóstico não são eficientes pela dificuldade de padronização antigênica das mesmas e pela detecção de IgM ao invés de IgG, pois os títulos de IgM são ondulantes durante a infecção (SCHULLER *et al.*, 1990).

Um ensaio de ELISA foi estabelecido por Hoelzle *et al.* (2007c) utilizando antígenos recombinantes e mostrou capacidade de ser utilizado para o diagnóstico de campo da ES. Técnicas moleculares, como o PCR foram desenvolvidas como sucesso para a identificação do *M. suis*, entre elas a amplificação do gene que codifica a subunidade 16s do rRNA (MESSICK *et al.*, 1999), de um fragmento específico com 1.8 kb do genoma do *M. suis* (HOELZLE *et al.*, 2003) ou o gene *rpoB* (GWALTNEY *et al.*, 1993). Estas técnicas permitem tanto o diagnóstico da forma aguda ou ainda na forma onde os animais estejam infectados e assintomáticos.

Posteriormente foi desenvolvida uma técnica de LightCycler real-time PCR com a utilização do gene conservado *msg 1* como região alvo. Este gene codifica uma proteína de superfície análoga a GAPDH que possibilitou a análise qualitativa e quantitativa de ES (HOELZLE *et al.*, 2007b). Outra técnica quantitativa disponibilizada é a de TaqMan PCR (GUIMARÃES *et al.*, 2011) que se mostrou com sensibilidade 100 vezes maior que o PCR tradicional.

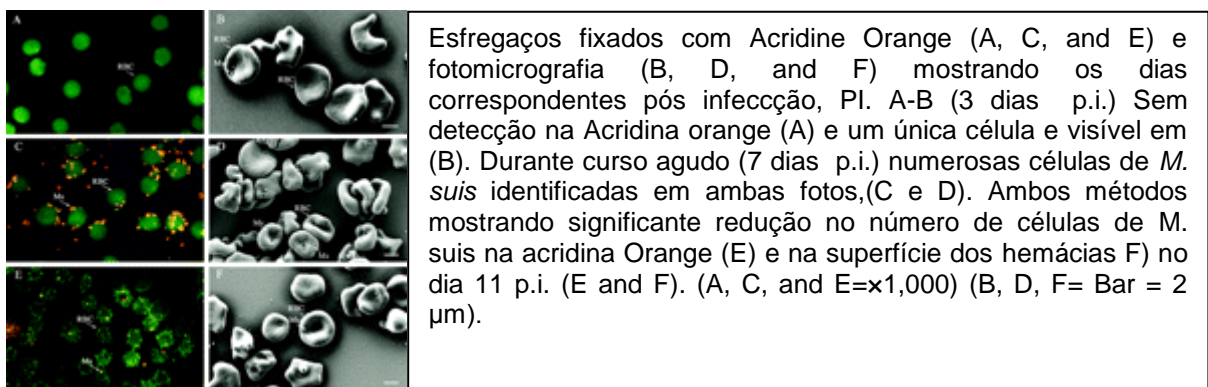


Figura 3 – Comparação da visualização da fixação em Acridina Orange x Microscopia eletrônica de varredura em animal infectado experimentalmente nos dias 3, 7 e 11 P.I.

Fonte: (GROEBEL, 2009).

1.6 CONTROLE

O método utilizado para o controle da ES é tradicionalmente a utilização de antibióticos e o manejo que envolve o controle do contato de sangue entre animais e insetos que podem transmitir o micoplasma por picadas (MATOS *et al.*, 2007). Embora estas práticas funcionem parcialmente, elas não eliminam o *M. suis* dos rebanhos ocasionando a manutenção de animais com infecção persistente e inaparente clinicamente possibilitando assim a retransmissão inter e entre rebanhos (THACKER, 2006).

A principal dificuldade no desenvolvimento de uma vacina efetiva é a impossibilidade do cultivo *in vitro* do agente sendo que vacinas derivadas de animais infectados foram testadas, porém estas podem conter componentes sanguíneos com possibilidades de reações imunes ou ainda da impossibilidade de atenuação por passagens em meios como naquelas vacinas oriundas de microorganismos cultiváveis. Também, os fatores de virulência ainda não estão estabelecidos, sendo que a ligação do micoplasma com a hemácia parece ser uma via crucial no desenvolvimento de uma vacina (HOELZLE *et al.*, 2009). A proteína de adesão utilizada recentemente numa vacina, a MSG1 apresenta região de muita conservação entre diferentes cepas de *M. suis* e gera boa produção de anticorpos e defesa celular, porém em desafio ela não protege da anemia causada pela infecção (HOELZLE, 2009).

O tratamento clínico para a ES é realizado com o uso de tetraciclinas na dose de 30mg/Kg e tratamento de apoio (MATOS *et al.*, 2007; THACKER, 2006; SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). Medidas que eliminem a possibilidade de transmissão, como o controle de insetos e piolhos e durante o manejo impedindo o contato de sangue infectado como no uso de agulhas, lâminas de castração e corte de dentes são imprescindíveis como profilaxia da ES (THACKER, 2006).

CAPÍTULO II – ARTIGO

DETECÇÃO DO MYCOPLASMA SUIS EM GRANJAS COM TRANSTORNOS REPRODUTIVOS

Ocurrence of swine eperitroozoonosis in farms with reproductive disorders.

**Luiz Carlos Bordin^a, Danielle Gava^b, Paulo Esteves^c, Camila Sá Rocha^d,
Nelson Morés^e, Eliana Knackfuss Vaz^f**

^a Médico Veterinário, Mestrando em ciência animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidades do Estado de Santa Catarina – CAV/ UDESC, Av. Luiz de Camões 32090, 88520-000 Lages, SC, Brasil. bordin@cnpsa.embrapa.br.

^b Pesquisadora Dr^a. Embrapa Suínos e Aves.

^c Pesquisador Dr. Embrapa Suínos e Aves.

^d Bolsista CNPQ, M.Sc. em Ciência Animal Embrapa Suínos e Aves.

^e Pesquisador M Sc. em Ciências Veterinárias Embrapa Suínos e Aves.

^f Professora Doutora do Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidades do Estado de Santa Catarina – CAV/ UDESC.

RESUMO

A Eperitrozonose Suína, (ES) causada pelo *Mycoplasma suis*, é uma doença infecciosa das hemácias e que causa uma série de transtornos associados à destruição destas células. Clinicamente a ES pode apresentar sinais evidentes de febre, inapetência, anemia e icterícia até infecções subclínicas com queda na imunidade e desempenho zootécnico. Transtornos reprodutivos também são frequentemente observados onde ocorrem os nascimentos de leitões fracos e natimortos e habilidade materna inadequada. Suínos portadores podem manter a enfermidade sem demonstrar sinais clínicos e predispor a granja ao aumento dos casos clínicos em meses quentes, nos quais a transmissão por insetos sugadores ocorre. O controle da ES é realizado evitando o contato de sangue infectado de animais doentes ou portadores durante o manejo e através do controle de insetos e parasitas sugadores. As tetraciclina, as quais hoje se encontram em uso restrito de acordo com a legislação europeia, são as principais opções terapêuticas, seja no tratamento curativo ou ainda como aditivo alimentar. Atualmente o diagnóstico da ES é realizado pela suspeita clínica e ou pela utilização de esfregaços sanguíneos que são pouco sensíveis e pouco específicos. A cultura *in vitro* do *Mycoplasma suis* não é possível dificultando o diagnóstico bem como a reprodução da doença. Diversas técnicas foram desenvolvidas para o diagnóstico da eperitrozonose, porém devido ao fato de a infecção ter picos sazonais, com tendência a cronificar, uma técnica padrão ainda não foi estabelecida. O objetivo do presente trabalho foi realizar estudo do papel da ES em granjas do Sul do Brasil com problemas reprodutivos. O método utilizado foi a padronização de uma técnica de PCR com controle interno de amplificação (CIA) e uma de PCR quantitativa em Tempo Real. O local de execução foi a Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, SC. Foram avaliadas 80 porcas e 196 amostras de tecidos fetais de fetos filhos destas porcas em 27 granjas com transtornos reprodutivos no estado de SC e PR. De cada porca foram coletados sangue e tecidos de dois leitões, sendo eles abortados, natimortos, inviáveis ou mumificados. Após a coleta dos tecidos, os mesmos foram armazenados em placa estéril a -70 °C para futura extração de DNA. Não foram detectados DNA do agente infeccioso no sangue das porcas, tampouco dos tecidos fetais analisados no PCR. O CIA desenvolvido foi amplificado em todas as reações. No PCR em Tempo Real houve 17% de porcas reagentes, porém em baixas concentrações. Das granjas, 40,74% tiveram pelo menos uma porca reagente. A ocorrência de resultados positivos não permitiu a associação de eperitrozonose como causa de transtornos reprodutivos na população avaliada. A PCR em Tempo Real mostrou-se sensível e específica e pode ser utilizada como ferramenta para diagnóstico de casos clínicos, subclínicos e de portadores.

Palavras-chave: doenças reprodutivas, suínos, PCR, PCR em Tempo Real eperitrozonose suína.

ABSTRACT

The Swine Eperythrozoonosis, (s) caused by *Mycoplasma suis*, is an infectious disease of the red blood cells and causing a series of disorders associated with the destruction of these cells. Clinically, the ES can vary with evident signs like fever, loss of appetite, anemia and jaundice or sub-clinical infections e with drop in zootechnical performance and immunity. Reproductive disorders are also frequently observed, where weak piglets births, stillbirths and inadequate maternal ability occurs. Pigs could be carriers without showing clinical signs and predispose the farms to increase clinical cases in hot months where bloodsucking insects transmission occurs and keep the disease. Control of ES is performed avoiding the infected blood contact of sick animals or carriers during the handling and by controlling insects and sucking parasites. The tetracyclines, which today are in restricted use in accordance with European legislation, are the main therapeutic option in curative treatment or as a food additive. Currently the diagnosis of ES is performed by clinical suspicion and or by the use of blood smears which are low sensitive and low specific. Culture of *Mycoplasma suis in vitro* is unable difficulting diagnosis as well as the reproduction of disease. Various techniques were developed for the diagnosis of eperythrozoonosis, but because infection has seasonal peaks with tendency to chronifying, a standard technique has not yet been established. The goal of this work was to carry out study of role of ES in farms of Southern of Brazil with reproductive disorders. The method used was to standardize a PCR technique with internal control of amplification (CIA) and a real-time quantitative PCR. The place of execution was Embrapa Swine and Poultry in Concordia, SC. The sample was composed by 80 sows and fetal tissue samples of 196 piglets children of these sows on farms with reproductive disorders in 27 farms from of SC and PR State. Of each sow were collected blood and tissues from two piglets being stillborn, impractical, aborted or mummified. After collecting the tissues, they have been stored in sterile card to -70 °C for future DNA extraction. Were not detected DNA of the infectious agent in the blood of fetal tissue either sows analyzed in the PCR. The CIA developed was amplified in all reactions. In real-time PCR 17% of sows were reagents, but in low concentrations. 40.74% of the farms had at least one sow reagent. The occurrence of positive results did not allow the association of eperythrozoonosis as a cause of reproductive disorders in the population evaluated. The real-time PCR proved to be sensitive and specific and can be used as a tool for diagnosis of subclinical and clinical cases as well carriers.

Keywords: reproductive disorders, pigs, PCR, Real Time PCR, eperythrozoonosis.

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de suínos no Brasil têm se destacado como o quarto produtor mundial de carnes desta espécie com um sistema produtivo preocupado constantemente com a saúde dos rebanhos e qualidade final dos produtos, baixo custo de produção e respeito ao meio ambiente. Como exportador ocupa também a quarta posição e busca estabelecer um comércio que obedeça aos requisitos dos países importadores no que diz respeito especialmente à qualidade intrínseca da carne e ao controle de resíduos de antibióticos e promotores de crescimento (USDA, 2010).

A eperitrozonose suína (ES) é uma enfermidade que vem sendo amplamente estudada em países produtores de suínos, pois causa doença clínica que leva a mortalidade e baixa na imunidade, além de se caracterizar como doença subclínica incorrendo em baixa de desempenho zootécnico em animais de crescimento e terminação. Também provoca processos febris em porcas no período periparto, ocasionando nascimento de leitões fracos, baixa na produção de leite e inadequada habilidade materna (RITZMANN *et al.*, 2008; BROWNBACK, 1981). Seu controle é baseado na utilização das tetraciclinas que atualmente encontra-se com uso limitado por países importadores de carne suína.

O *Mycoplasma suis* é o agente causador desta doença e que até pouco tempo era conhecido como *Eperithrozon suis*. Sua transmissão está relacionada a contato sanguíneo direto em situações de manejo como castrações, vacinações e corte de dentes ou ainda em casos de canibalismo e sangramentos. A picada de alguns parasitas como moscas, mosquitos e o carrapato *Haematopinus suis*, em especial em períodos quentes, podem transmitir o agente (THACKER, 2006).

Embora a ES tenha sido descrita em diversos países do mundo, alguns aspectos clínicos ainda são desconhecidos. O *M. suis* depende diretamente da permanência dentro da hemácia e por isso este agente ainda não é cultivável *in vitro* dificultando os estudos de sensibilidade a agentes antimicrobianos e perfis epidemiológicos (WU *et al.*, 2006). A transmissão por ectoparasitas pode também caracterizar a ES como doença sazonal, especialmente em países tropicais. Deste modo, diversos métodos de diagnóstico foram descritos como tentativa de estabelecer uma prova padrão para o diagnóstico da doença clínica (HOELZLE,

2007). Métodos diretos como a visualização do agente em esfregaços em lâminas apresentam baixa sensibilidade e especificidade, pois o *M. suis* pode invadir e permanecer dentro das células vermelhas (GROEBEL, 2009). Outras provas baseadas na resposta imunitária como ELISA e Fixação do Complemento foram desenvolvidas, porém carecem do conhecimento da patogenia para servir como ferramenta efetiva para respostas clínicas. A biologia molecular tem sido utilizada preenchendo esta lacuna da falta de uma prova padrão (HOELZLE, 2007).

O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de *M. suis* em sangue de porcas e tecidos de leitões oriundos de granjas com transtornos reprodutivos, utilizando como ferramenta a PCR convencional (PCR) e a PCR quantitativa (qPCR).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

O projeto foi desenvolvido em Concórdia/SC, na Embrapa Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, especificamente no Laboratório de Sanidade e Genética Animal, laboratórios de Microbiologia e Virologia Animal.

2.1.1 Seleção das granjas

Foram selecionados 27 rebanhos de suínos dos Estados de Santa Catarina e Paraná para participarem do projeto com o objetivo de diagnosticar patógenos causadores de falhas reprodutivas em matrizes suínas. As amostras foram colhidas de julho de 2008 a julho de 2009. Para fazerem parte do projeto, os rebanhos apresentavam uma ou mais taxas reprodutivas alvo inadequadas como: taxas de aborto acima de 4 %, retorno ao cio acima de 15%, mumificação acima de 15% ou natimortos acima de 10%. O rebanho a ser incluído na pesquisa deveria apresentar ao menos uma das variáveis acima dos níveis de interferência.

2.1.2 Colheita das amostras

Nos 27 rebanhos selecionados foram escolhidas cinco porcas de cada granja que estivessem em trabalho de parto no momento das viagens de coleta e que haviam abortado ou parido leitões mortos, mumificados ou inviáveis (com menos de 800 gramas) para a produção. De cada porca (leitegada) eram colhidos dois leitões com estas características. As necropsias foram realizadas nas próprias granjas ou nos laboratórios da Embrapa Suínos e Aves. Foi recomendada a realização da necropsia até 12 horas após o parto, seja nas granjas ou após envio sob-refrigeração para o laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves. Alguns fetos apresentavam estado avançado de autólise levando a perda de aproveitamento para a realização dos exames laboratoriais. Naturalmente, a chance de encontrar órgãos de fetos natimortos e mumificados com início de autólise é considerável, por isso para um diagnóstico laboratorial eficaz leva-se muito em conta as condições em que as amostras são armazenadas e colhidas. Foi colhido um total de 230 amostras de tecidos de leitões necropsiados entre natimortos, mumificados, abortados e inviáveis. Efetivamente, os números de amostras viáveis testadas foram: 80 amostras de sangue das fêmeas, 88 amostras de baço dos leitões, 108 amostras de fígado dos leitões, totalizando 276 amostras. Nas necropsias foi colhido um fragmento de fígado e baço, armazenado em placa estéril e acondicionado a -70°C, para futura extração de DNA. Das porcas foram colhidos 20 mL de sangue total da jugular com adição de anticoagulante EDTA e levados para armazenamento a -70 °C.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os órgãos foram submetidos à extração de DNA pelo método da Proteinase K e fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os tecidos fetais foram macerados (aproximadamente 1 g da amostra) até ficarem homogêneos. A digestão de todas as amostras (órgãos) foi feita com 1 mL de tampão de lise 2 X (ANEXO) e 20 µL de Proteinase K (Invitrogen™ - ANEXO). A extração foi feita com fenol (Invitrogen™), clorofórmio (Sigma®) e álcool isoamílico (Vetec®), nas proporções 25:24:1. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de sódio

(ANEXO) a um volume final de 10% da solução e 1 mL de etanol absoluto gelado (-20°C), permanecendo em freezer a -70°C por quatro horas ou a -20°C por 16 horas, para precipitar o DNA. Após, as amostras foram centrifugadas a 14.000 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, realizou-se lavagem com etanol 70% gelado (-20°C), o DNA precipitado foi ressuspenso com TE conforme o tamanho do pellet (30 µL para pellet “invisível”, 50 µL para pellet pequeno e 100 µL para pellet grande) e armazenado a -70°C. Para o sangue das porcas utilizou-se o kit comercial (Illustra blood genomicPrep Midi Flow Kit-GE Healthcare®) conforme orientação do fabricante (Figura 5).



Figura 4 – Etapa da extração do DNA de sangue total das porcas
Fonte: Próprio autor.

2.3 CONTROLES POSITIVOS

Os controles positivos foram gentilmente cedidos pelas Dras. Joanne Messick e Ana Márcia Sá Guimarães da Universidade de Purdue, Indiana, EUA. As amostras eram de origem de DNA plasmideal (~1400pb do gene 16S rRNA do *M. suis*) e de DNA de suíno infectado experimentalmente com *M. suis* na concentração de 10^8 a 10^9 microorganismos por µL.

2.4 CLONAGEM DE DNA PLASMIDEAL

2.4.1 Clonagem de fragmentos amplificados

As amostras de DNA plasmideal foram submetidas a clonagem com o Kit TOPO TA cloning®, (Invitrogen™).

Foi feita uma ligação na amostra de DNA purificado (inserto) utilizando 1,0 µL de DNA e 3,0 µL de água ultrapura. Em cada uma das ligações também se utilizou 1,0 µL do vetor pCR®2.1-TOPO® 3,9 kb e 1,0 µL de Salt Solution, totalizando 6,0 µL cada ligação. As ligações foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente.

As cepas utilizadas foram de *Escherichia coli* DH5α competentes e foram transformadas para as clonagens com pCR®2.1-TOPO® 3,9 kb da após terem sido adicionados 100 µL de células competentes a 2 µL das ligações e que mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, realizou-se o choque térmico em banho-maria a 42°C durante 30 segundos, seguido de nova incubação em banho de gelo durante dois minutos. Após, foram adicionados 250 µL de meio SOC (ANEXO) às células transformantes, incubando-as sob agitação a 200 rpm a 37°C durante uma hora e 30 minutos.

As placas foram preparadas em capela de fluxo laminar com meio LB (ANEXO) adicionados com ampicilina (50 µg/mL – 1 µL/1mL) e algumas placas sem ampicilina, para serem utilizadas como controle (apenas com DH5α). Foram preparadas duas placas, colocando 100 µL em cada placa. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C por 18 a 21 horas. Após, foi verificado o crescimento de colônias bacterianas. Foram utilizados tubos de 15 mL onde se colocou 3 mL de meio LB líquido e 3 µL de ampicilina (50 µg/mL). Com uma alça de semeadura, algumas colônias foram selecionadas e semeadas em meio LB líquido com ampicilina para em seguida serem incubados sob agitação a 200 rpm a 37°C durante 18 a 21 horas.

2.4.2 Extração do DNA plasmideal recombinante

Foi utilizado na extração do DNA plasmideal, 3 mL do cultivo obtido no item anterior e centrifugado a 8000 rpm a 4°C por um minuto. Em seguida foi descartado

o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso com 100 μL de Solução I gelada (ANEXO). Foram adicionados 200 μL de Solução II (ANEXO), invertendo gentilmente o microtubo por algumas vezes para misturar o conteúdo. Em seguida, a este microtubo no gelo, foi adicionado 150 μL de Solução III também gelada (ANEXO), invertendo gentilmente o microtubo. As amostras foram então incubadas em gelo por cinco minutos para depois serem centrifugadas a 12.500 rpm a 4°C por 10 minutos. O DNA plasmideal foi extraído em capela de exaustão, com 220 μL de fenol e 220 μL de clorofórmio, sendo centrifugado em seguida a 12.500 g a 4°C durante cinco minutos. O sobrenadante foi recuperado em tubos novos e então precipitado com 900 μL de etanol absoluto em temperatura ambiente, por dois minutos. A amostra foi então centrifugada a 12.500 rpm a 4°C durante cinco minutos com descarte da fase superior e adicionado 1mL de etanol 70% gelado (ANEXO) ao microtubo. Nova centrifugação foi realizada a 12.500 rpm a 4°C durante cinco minutos. Finalmente foi descartado o etanol e o pellet foi desidratado à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 μL de TE com RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As amostras de DNA plasmideal em suspensão foram incubadas a 37°C por 10 minutos para produzir uma suspensão homogênea de DNA. Após, as mesmas foram armazenadas a -20 °C.

2.4.3 Comprovação da eficiência da clonagem

Para comprovar que a clonagem foi bem sucedida, o DNA plasmideal extraído anteriormente foi submetido à clivagem com enzima de restrição ECO RI e amplificação por PCR onde foi aplicado 4 μL do DNA plasmideal em gel de agarose 1%.

2.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL (PCR)

A PCR foi baseada, conforme descrito, em estudos conduzidos por Messick, (1999). Na preparação das reações foi utilizado um kit comercial (Invitrogen™ - Taq DNA Polimerase, 10 X PCR Buffer, Magnésio 50 mM). As quantidades de reagentes foram sendo testadas variando as quantidades de magnésio 50mM (1,0; 2,0 e 3,0mM), dNTPs 10mM (0,5 e 1,0 μL), primers 10pmol (0,75 e 1,0 μL) (Tabela 1) e

temperatura de anelamento dos primers (53°, 54°; 56°; 58°; 60° e 62°C). Foram utilizados dois termocicladores sendo, termociclador (MJ Research, Inc®) e Thermo Electron Corporation Px2 Thermal Cycler.

A solução ficou definida com 1,00 µL de Magnésio 50 mM, 1 µL de dNTP, 0,75 µL de cada primer (Tabela 1) forward e reverse (10 pmol) e 0,30 µL da enzima Taq polimerase (5 U/µL) e 0,5 µL de Controle Interno. A amplificação das reações foi realizada em termociclador (MJ Research, Inc®) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguido por 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 53°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para controle negativo das reações utilizou-se 2,5µL de água ultrapura. As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL por amostra, sendo 109,4 ng de DNA (2,5 µL) da amostra a ser testada e 22,5 µL de uma mistura contendo 15, 2,1 µL de água ultrapura estéril, 2,5 µL de 10X Buffer.

Para o controle positivo, foram utilizados 109,4 ng de um DNA sabidamente positivo e proveniente de leitão esplenectomizado e inoculado com *M.suis*. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, em cuba horizontal da seguinte maneira: 16 µL da reação de amplificação junto com 1,5 µL de tampão de corrida gLB (ANEXO) foram aplicados em gel de agarose 1% (Invitrogen®- ANEXO) corado com 5 µL de Brometo de Etídio (5 µg/mL - SIGMA®). Cinco µL de um marcador de peso molecular de 100 pares de bases foram aplicados no gel, a fim de comparar com o peso molecular do fragmento amplificado. Para a eletroforese, cobriu-se o gel com TBE a 0,5 X (ANEXO) ajustando a fonte a 100 V por aproximadamente 50 minutos. A visualização do produto amplificado foi realizada por transiluminação em luz ultravioleta.

Tabela 1- Sequências e posições de nucleotídeos dos primers da PCR para *Mycoplasma suis*

Primers	Sequências	Posição dos Nucleotídeos
E. suis f2	GCT TAA CAA GTG TTC GCG GT	597 →616
E. suis r2	CTT AAC TCC AAT CAA AAT TAC C	1415 →1436

Fonte: (MESSICK, 1999).

2.6 CONTROLE INTERNO (CIA)

O controle interno de amplificação (CIA) de 100 pb foi elaborado tendo por base a sequência da região alvo da PCR e sintetizado pela (Invitrogen™). O CIA liofilizado (34,4 nM) foi ressuspensão em 68,8 µL de TE, apresentando uma concentração final de 500 pmol. O material foi então diluído 1/10.000 e utilizado para nova padronização da PCR anteriormente estabelecida (MESSICK *et al.*, 1999). O controle interno desenvolvido foi utilizado em todas as reações e conforme esperado foi observada a amplificação em gel numa concentração final de 500 pmol diluído a 1:10.000 na quantidade de 5 µL (figura 6).

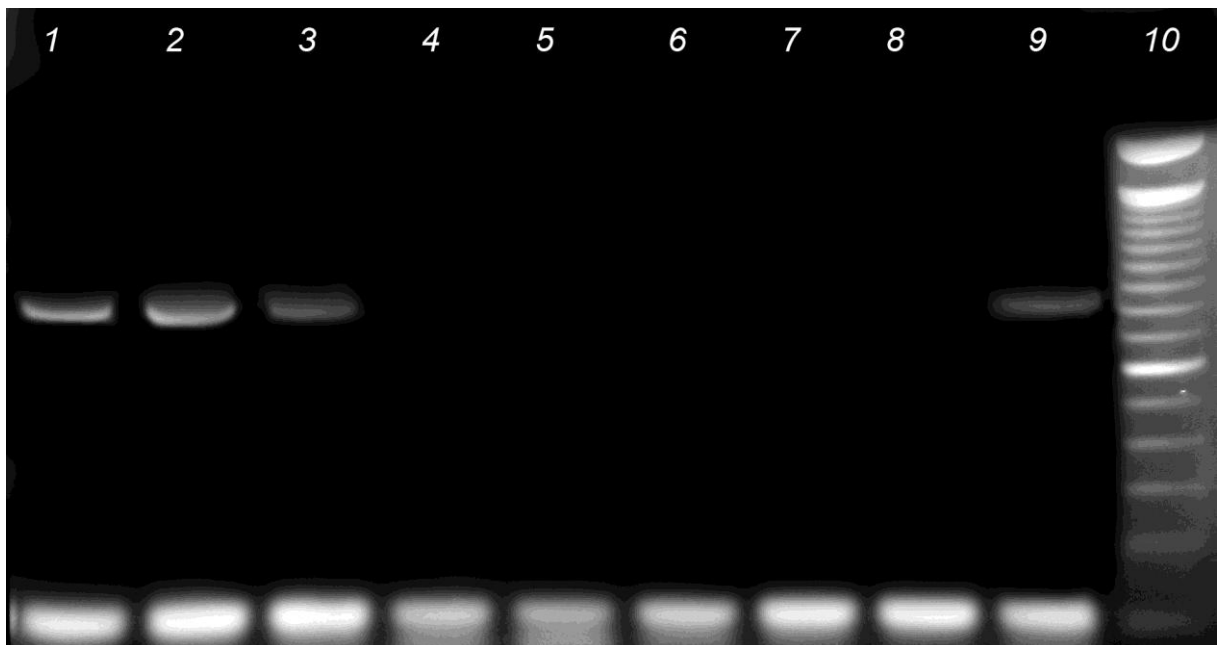


Figura 5 – Padronização do CIA: 1- Plasmídeo com $3,28 \times 10^9$ moléculas/µL, 2- 10^8 moléculas/µL, 3- 10^7 moléculas/µL, 4- 10^6 moléculas/µL, 5- 10^5 moléculas/µL, 6- 10^4 moléculas/µL, 7- 10^3 moléculas/µL, 8- Controle negativo (água ultrapura), 9- Controle positivo, 10- Marcador 100 pb (Cenbiot®).

Fonte: Próprio autor.

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

2.7.1 Construção dos primers e sonda e construção do plasmídeo

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), usando o sistema de detecção TaqMan[®], utilizou primers e sonda segundo descrito por Guimarães *et al.* (2011). Os primers foram criados para amplificar um fragmento de 157pb da região 16S rRNA do *Mycoplasma suis*, onde: Forward (5'-CCC TGA TTG TAC TAA TTG AAT AAG-3') e Reverso (5'-GCG AAC ACT TGT TAA GCA AG-3'). A sonda utilizada foi a 6-carboxifluoresceína (FAM) com o corante “reporter” fluorescente na extremidade 5' e o corante (MGB-NQF) “quencher” não fluorescente na extremidade 3' (5'FAM-TGR ATA CAC AYT TCA G –MGBNFQ-3').

2.7.2 Otimização da qPCR

O Controle positivo foi o mesmo utilizado anteriormente na PCR convencional. Após a purificação, o plasmídeo recombinante foi quantificado em espectrofotômetro ND-2000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Diluições seriadas em base 10 foram preparadas em solução Tris-EDTA 10mM (pH8,0) e estocadas a -80°C.

O mix da reação consistiu em 2µL (200ng) de DNA extraído do plasmídeo recombinante, 12,5µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 20µM de primer forward e reverso (50nM, 300nM e 900nM), 10µM e 20µM de sonda (FAM-MGB/NQF) e água destilada em quantidade suficiente para 25µL.

A detecção foi realizada utilizando o ABI Prism 7500 sequence detection system, com as seguintes condições: ativação da uracil-N-glycosylase a 50°C por 2 minutos, seguido da ativação da PCR a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C). Controles negativos foram inseridos ao longo da placa, bem como controle positivo em diluição base 10 de 10⁰ até 10⁹ moléculas/µL.

2.7.3 Sensibilidade da qPCR

Para determinar o limite de detecção e eficiência do ensaio o plasmídeo recombinante foi usado como padrão e sericamente diluído em base 10, produzindo $3,28 \times 10^0$ a $3,28 \times 10^9$ moléculas/ μL . A sensibilidade também foi comparada com a PCR convencional.

2.7.4 Especificidade e reprodutibilidade da qPCR

Reações com o plasmídeo recombinante de *M. suis* diluído em base 10, e com outros Mycoplasmas (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorinis* e *M. flocculare*), além de controles negativos (água Milli Q) foram utilizados. A reprodutibilidade intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada com seis replicatas em três corridas diferentes, em dias separados. Essas replicatas foram usadas a fim de determinar a média, desvio padrão e coeficiente de variação do *Ct value* para cada diluição do plasmídeo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

3.1.1 Sensibilidade da PCR

Diluições em base 10 do plasmídeo de *M. suis* foram usadas para observar a amplificação em gel, baseado no logaritmo do número de cópias do plasmídeo. Foram analisadas desde $3,28 \times 10^9$ a $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μL . A sensibilidade alcançada com a PCR convencional detectou $3,28 \times 10^7$ moléculas/ μL , sendo a PCR 100.000 vezes menos sensível que a qPCR .

3.1.2 Teste de amostras de campo

Foram testados 276 amostras, sendo 80 fêmeas e 196 amostras de tecidos fetais mumificados ou natimortos das 27 granjas diferentes. Das fêmeas foi avaliado

sangue total e dos fetos foram avaliados baços e fígado. Todos os tecidos dos fetos foram negativos por PCR. Todas as amostras das fêmeas foram negativas por PCR (Figura 6).

A ausência de amplificações nos tecidos fetais e sangue das porcas pode ter sido influenciada por diversos fatores, tais como as condições das amostras oriundas de fetos em estados de autólise ou mumificação, pela quantidade de amostras utilizadas no estudo ou ainda pela técnica utilizada na extração do DNA.

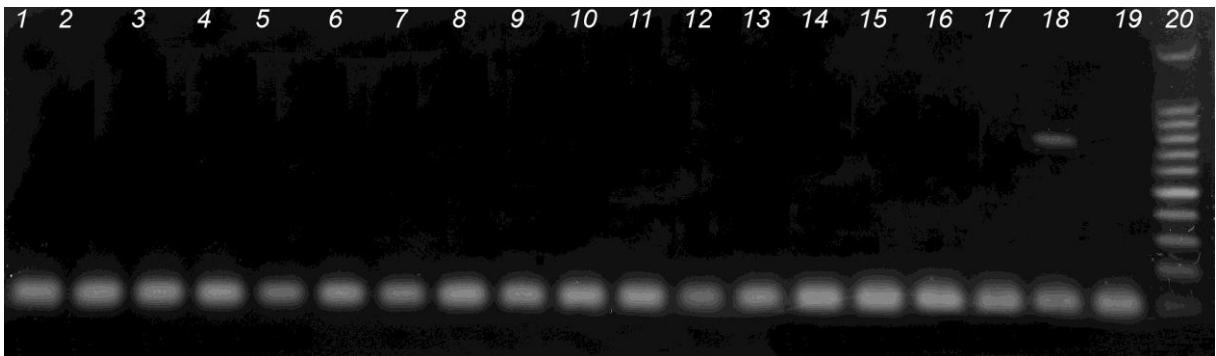


Figura 6 – Amostras de sangue das porcas testadas: (1) a (17) testes sem amplificação de DNA; (18) Controle positivo, (19) Controle negativo (água ultrapura); (20) Marcador 100 pb (Cenbiot®).

Fonte: Próprio autor

3.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

3.2.1 Otimização da qPCR

A otimização dos componentes da reação foi conduzida usando controles positivos e negativos. Primers e sonda foram diluídas a fim de determinar as condições finais, as quais foram de 900nM de primers e 10 μ M de sonda. Estas condições foram definidas baseadas na combinação que forneceu a máxima fluorescência e o menor valor de número de ciclos (Ct value) na ausência de dímeros ou amplificação inespecífica.

3.2.2 Sensibilidade da qPCR

Diluições em base 10 do plasmídeo de *M. suis* foram usadas para construir uma curva padrão, baseado no logaritmo do número de cópias do plasmídeo versus a medida do *Ct value*. A curva padrão teve uma dinâmica de $3,28 \times 10^9$ a $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μL , com uma correlação linear (R^2) de 0,993 e inclinação da reta (*slope*) de -4,14. Os *Ct value* médios variaram de 8,33 a 37,60 (Tabela 2). Ao comparar a sensibilidade com a PCR convencional, a qPCR foi capaz de detectar até $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μL , enquanto que a PCR detectou somente até $3,28 \times 10^7$ moléculas/ μL , sendo a qPCR 100.000 vezes mais sensível que a PCR (Figura 7).

3.2.3 Especificidade e reprodutibilidade da qPCR

A especificidade da TaqMan qPCR foi avaliada frente a três diferentes *Mycoplasmas* e água como controle negativo. Forte sinal fluorescente foi obtido com *M. suis*, enquanto que os sinais para *M. hyopneumoniae*, *M. hyorinis*, *M. flocculare* e água foram equivalentes aos níveis basais (Figura 8).

O intra e inter ensaio da reprodutibilidade foi conduzido, no qual o coeficiente de variação do intra ensaio foi de 1,25 a 4,63, enquanto que do inter ensaio foi de 1,43 a 5,58, indicando que a qPCR foi altamente reproduzível (Tabela 2).

3.2.4 Teste de amostras de campo

Foram testados 276 amostras de animais, sendo 80 fêmeas e 196 amostras de tecidos de fetos mumificados ou natimortos, de 27 granjas diferentes. Das fêmeas foi avaliado sangue e dos fetos foram avaliados baços e fígado. Todos os tecidos dos fetos foram negativos por PCR e qPCR. Todas as amostras das fêmeas foram negativas por PCR. Das 14 amostras das 80 (17,5%), de 11 granjas diferentes, foram positivas por qPCR, com carga bacteriana variando de $1,32 \times 10^2$ a $2,61 \times 10^5$ moléculas/ μL (Figura 9). Cabe ressaltar que as amostras de campo não tinham como foco granjas suspeitas de infecção por *M. suis* como em outros trabalhos conduzidos anteriormente (SMOLA *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2007). Assim, a ausência de amplificações pode ser acenada junto com as técnicas de extração de DNA e a baixa qualidade dos tecidos oriundos das necropsias.

Tabela 2 – Avaliação da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica de TaqMan qPCR para *M. suis*, mostrando os valores de Ct Médio, desvio padrão e coeficiente de variação intra e inter placa para cada diluição do plasmídeo (10^9 a 10^2 moléculas/ μ L)

Diluição	Ct Médio	DP Intraplaca	CV Intraplaca	DP Interplaca	CV Interplaca
10^9	8,33	0,22	2,63	0,22	2,60
10^8	13,33	0,31	2,36	0,37	2,81
10^7	18,13	0,84	4,63	0,58	3,22
10^6	22,62	0,44	1,94	1,26	5,58
10^5	26,81	0,46	1,73	1,44	5,39
10^4	30,55	0,43	1,41	0,99	3,26
10^3	34,28	0,43	1,25	0,61	1,78
10^2	37,60	0,48	1,27	0,54	1,43

Fonte: Próprio autor.

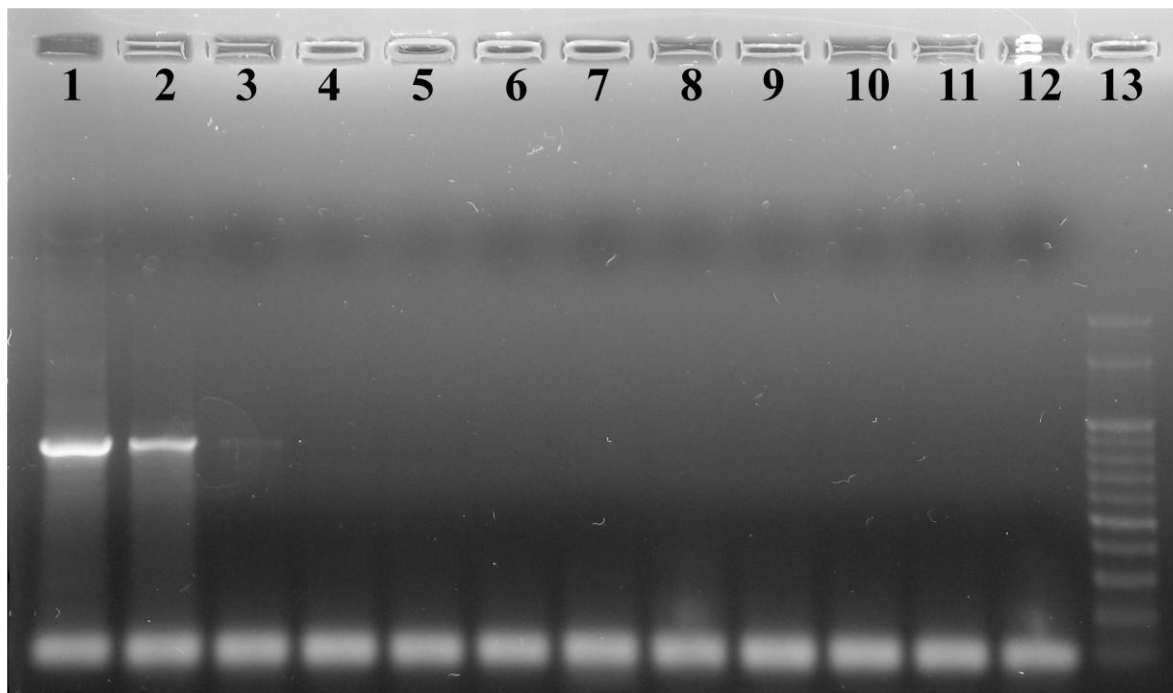


Figura 7 – Sensibilidade da PCR. 1- Plasmídeo com 10^9 moléculas/ μ L, 2- 10^8 moléculas/ μ L, 3- 10^7 moléculas/ μ L, 4- 10^6 moléculas/ μ L, 5- 10^5 moléculas/ μ L, 6- 10^4 moléculas/ μ L, 7- 10^3 moléculas/ μ L, 8- 10^2 moléculas/ μ L, 9- 10^1 moléculas/ μ L, 10- 10^0 moléculas/ μ L, 11- Controle negativo 1, 12- Controle negativo 2, 13- Marcador 100pb.

Fonte: Próprio autor.

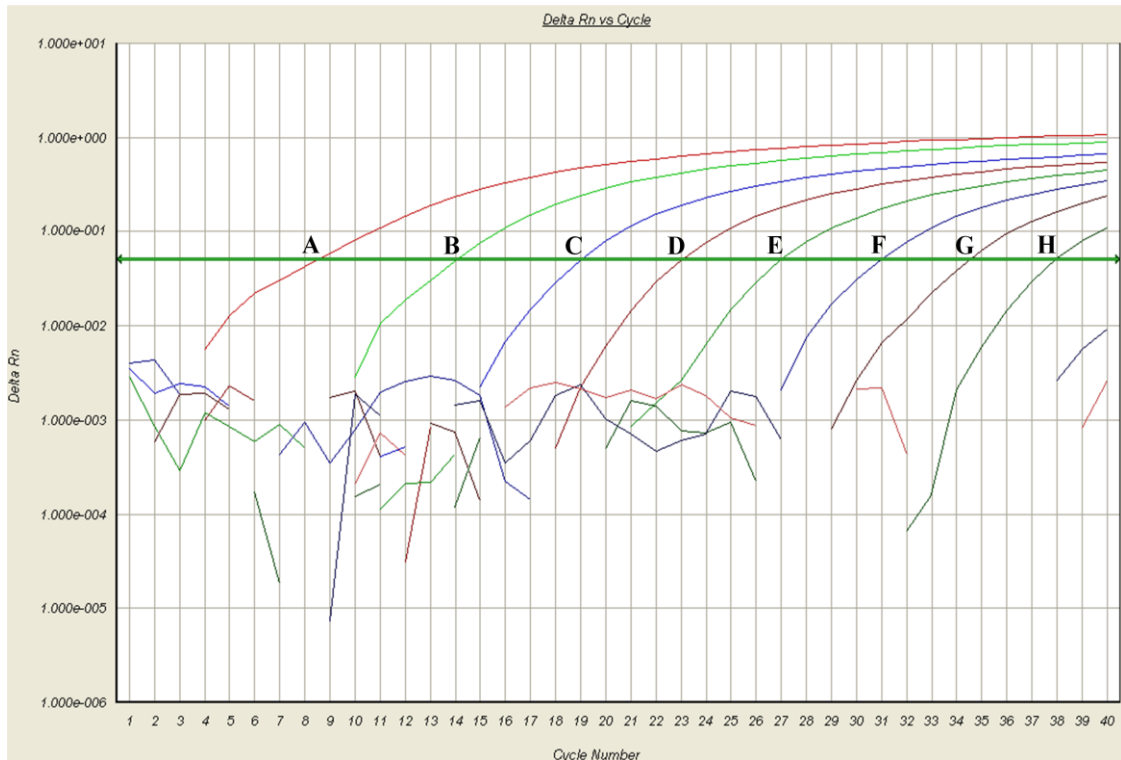


Figura 8 – Especificidade da TaqMan qPCR para *M. suis*. O ensaio foi conduzido em diluição de base 10 do plasmídeo (A-H / $3,28 \times 10^9$ a $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μ L), *M. hyopneumoniae*, *M. hyorinis*, *M. flocculare*, e água como controle negativo.

Fonte: Próprio autor.

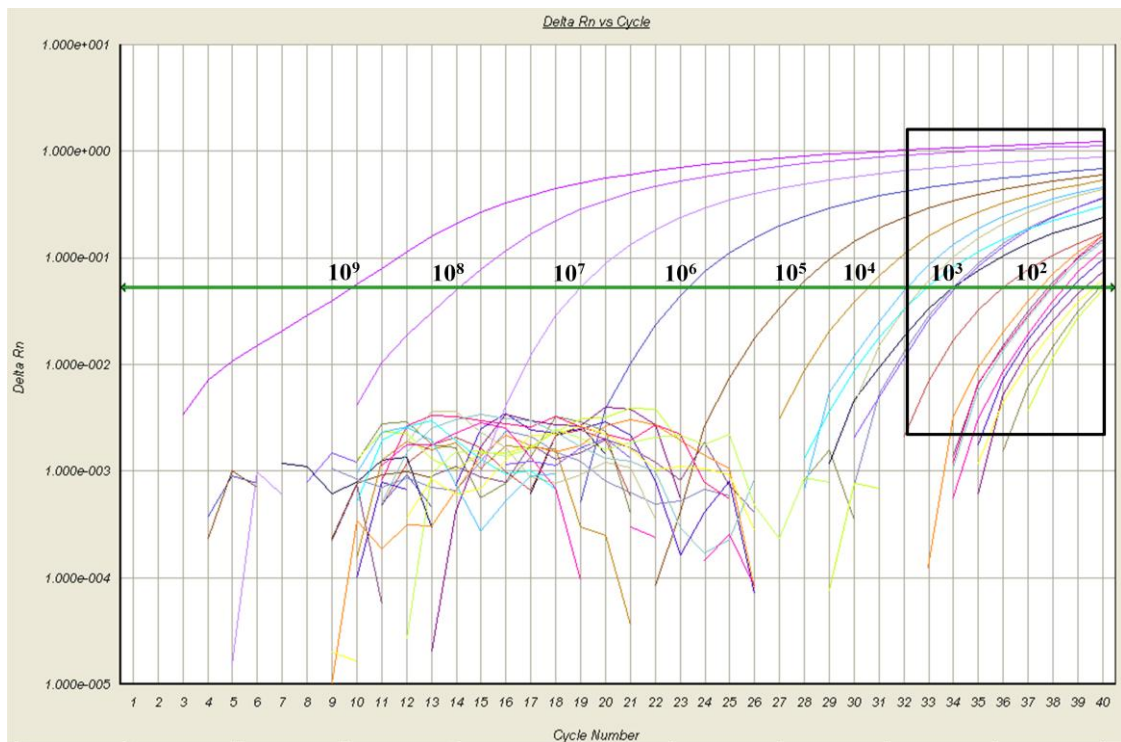


Figura 9 – Amostras de sangue de 80 fêmeas testadas por TaqMan qPCR para *M. suis*. O ensaio foi conduzido em diluição de base 10 do plasmídeo ($3,28 \times 10^9$ a $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μ L). Quatorze amostras foram positivas e estão localizadas no intervalo marcado pelo quadro preto, com carga bacteriana variando de $1,32 \times 10^2$ a $1,21 \times 10^4$ moléculas/ μ L.

Fonte: Próprio autor.

Atualmente, exceto em condições experimentais, é difícil encontrar laboratórios disponibilizando diagnóstico da ES. No Brasil, a ES ainda é diagnosticada somente de forma clínica, como ocorria quando ainda foi considerada suspeita a sua ocorrência (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). As técnicas de esfregaço sanguíneo apresentam baixa sensibilidade e especificidade e não demonstrou ser útil em suínos sem evidências clínicas em avaliação em suínos de abate no Brasil (KUCHIISHI, 2001). Naqueles suínos com evidências clínicas, a sua possibilidade de diagnosticar depende ainda da carga infectiva no sangue no momento da coleta, sendo que esta carga representaria o estado clínico do animal (RITZMANN, 2008). A imunofluorescência tem sensibilidade 40 % superior ao exame microscópico Zhang, (2004), bem como o método de ELISA é considerado sensível e específico. A ES é uma infecção intracelular e os mecanismos de resposta imunitária são do tipo celular, o que dificulta a utilização de provas de diagnóstico baseado em anticorpos principalmente pela ondulação destes no curso da doença. Ademais, a sazonalidade representa um fator importante e depende diretamente da ocorrência de mosquitos e outros insetos sugadores na manutenção e picos de infecção em determinadas granjas e regiões. Assim, poucos relatos epidemiológicos estão disponíveis demonstrando a real prevalência da ES em determinadas regiões produtoras de suínos no mundo.

Estudos prévios em granjas comerciais no Sul do Brasil, utilizando técnicas moleculares, evidenciaram a prevalência de 18% em porcas utilizando PCR convencional baseada no gene β -actina+. Entretanto, quando as amostras foram submetidas à técnica de Southern Blot a prevalência aumentou para 33% (GUIMARÃES *et al.*, 2007). Neste mesmo trabalho, entre 61 leitões testados, apenas 1 (um) foi positivo pela PCR.

Resultados da República Tcheca (SMOLA *et al.*, 2008) mostraram 70,8% de leitões recém-nascidos e natimortos prevalentes utilizando a técnica de PCR. Já em tecidos (baço) destes leitões natimortos, 80% foram positivos em uma das granjas e 97,77% em outra granja estudada, indicando que pode haver infecção transplacentária como descrito por Henderson *et al.* (1997). Em leitões recém-nascidos ocorreu prevalência de 53,5% em soro sanguíneo em uma das granjas estudadas. Vieira (2010) relata que a utilização isolada PCR é limitada, sendo que as técnicas combinadas mais sensíveis devem ser recomendadas para um diagnóstico seguro. Na China, Wu (2006) registrou que em 2002 a ES causou uma

morbidade de 30% e mortalidade de 10–20%. Relatou ainda que embora provas diagnósticas tenham sido desenvolvidas como ELISA e PCR, tradicionalmente, o diagnóstico é ainda baseado no histórico clínico e exame de esfregaços sanguíneos em microscopia óptica.

Guimarães *et al.* (2011) comparou a sensibilidade entre PCR e qPCR verificando que esta alcançou 100 logs maior para os mesmos plasmídeos estudados e extraídos de sangue total. O qPCR ainda mostrou-se o dobro em eficiência quando comparado com a técnica de Southern blot. O PCR convencional têm sido com êxito usado para diagnosticar *M. infections suis* em suínos durante todo o curso da infecção (GWALTNEY *et al.*, 1993; MESSICK *et al.*, 1999; HOELZLE *et al.*, 2003), porém os casos crônicos de ES são a maioria das infecções e neste caso a qPCR demonstra ser eficiente na identificação subclínica e portadora.

Hoelzle (2007) desenvolveu teste para o gen LC MSG1 real-time PCR LightCycler PCR em que a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 96.7%. Foram utilizados 25 animais com doença clínica e 25 animais saudáveis. Todas as amostras tiveram resultados positivos com a técnica de real-time PCR. Na Suíça, 19 entre 100 amostras de sangue de porcas resultaram positivas e 17 entre 160 leitões de creche foram positivos na Alemanha. Conclui-se que a técnica baseada no gen LC MSG1 é uma ótima ferramenta para diagnóstico de patogênese e estudos da prevalência. O real-time PCR é uma técnica que oferece uma alta capacidade de padronização, reprodutibilidade, automação e baixo risco de contaminação.

Ritzmann (2008) conduziu estudo da prevalência em leitões de creche na Alemanha utilizando a técnica quantitativa de real-time LightCycler PCR. Houve detecção de 164 de 1176 leitões (20–30 kg; 13.9%) e de 79 de 196 granjas (40.3%). Também comparou resultados entre a qPCR e esfregaços sanguíneos corados com Acridine-Orange, em que verificou uma considerável baixa sensibilidade do teste microscópico (35- 1176), sendo que estes resultados estão relacionados a altas cargas de infecção. Observa que embora tenham sido descritos novos métodos de diagnóstico, a prevalência e impacto da ES permanecem desconhecidos. Conclui ainda que a ES frequentemente esta subdiagnosticada na produção industrial de suínos e está associada à perda de lucro no setor. A técnica de LightCycler PCR pode ser uma ferramenta apropriada para a identificação de animais com infecção crônica ou subclínica para tomadas de ação de tratamento clínico.

Wu (2006) destaca a importância de medidas de controle e prevenção, incluindo os meios de transmissão, de redução de estresse e tratamento preventivo, bem como as oxitetraciclinas como aditivos alimentares e tratamentos curativos.

A PCR quantitativa em Tempo Real alcançou uma sensibilidade e especificidade alta, provando ser eficiente no diagnóstico da presença do DNA do *M. suis*, tanto em infecções clínicas e subclínicas, como em casos de portadores assintomáticos.

4 CONCLUSÃO

- A técnica de PCR convencional foi padronizada e foi capaz de detectar até $3,28 \times 10^7$ moléculas/ μL .
- A técnica da qPCR foi padronizada e foi eficiente em detectar até $3,28 \times 10^2$ moléculas/ μL , sendo a qPCR 100.000 vezes mais sensível que a PCR .
- 14 amostras de sangue de porcas de 80 (17,5%), de 11 granjas diferentes (40,75%), foram positivas por qPCR, com carga bacteriana variando de $1,32 \times 10^2$ a $2,61 \times 10^5$ moléculas/ μL .
- Não foi possível relacionar o *Mycoplasma suis* com a ocorrência de transtornos reprodutivos.

5 REFERÊNCIAS

ALMOND, G. W. Diseases of the Reproductive System. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine 9th ed.** Ames: Blackwell Publishing, 2006.

BRONWBACK, A. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. **Vet Med Small Animal Clinical**, v. 76, p. 375-378, 1981.

GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M.M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L.E. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes **Infection and Immunity**, v. 77, n.2, 2009.

GUIMARAES, A. M.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 13, 2007.

GUIMARAES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; POLETTO, R.; VEMULAPALLI, R.; SANTOS, A.P; DE MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, L.C.; MARCHANT-FORDE, J.N. ;TIMENETSKY, J.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, 2011.

GWALTNEY, S. M.; HAY, M. P.; OBERST, R. D. detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, 1993.

HENDERSON, J. P; O`HAGAN, J.; HAWE, S. M.; PRATT, M. C. H. Anaemia and low viability in piglets with *Eperythrozoon suis* . **Veterinary Record**, v. 140, 1997.

HOELZLE, L. E.; ADEL, D.; HOELZLE, K.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M. M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*)in porcine blood. **Veterinary Microbiology**, v. 93, 2003.

HOELZLE, L. E.; HELBLING, M.; HOELZLE, K.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M. M. First Light Cycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, 2007.

KUCHIISHI, S.; CARVALHO, L. F. O. S.; MACHADO, R. Z. Parasitismo por *Eperythrozoon suis* em suínos de abate. **Anais da ABRAVES**. Artigos científicos, v.2, 2001.

LIMA, E. S. de. **Diagnóstico sorológico de doenças infecciosas causadoras de falhas reprodutivas em suínos**. 2010. (Dissertação). Centro de Ciências Agroveterinárias/UEDESC, Lages.

MESSICK, J. B; COOPER, S. C.; HUNTLEY, M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, 1999.

PORTIANSKY E. L.; QUIROGA, M. A.; MACHUCA, M. A.; PERFUMO, C. J. *Mycoplasma suis* em suínos naturalmente infectados: um estudo ultra-estrutural e morfométrico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n.1, 2004.

RITTERBUSCH, G. A. **Estudo da patogenicidade e investigação de co-infecção por circovírus suíno e torque teno suíno em material proveniente de porcas com patologias reprodutivas**. 2009. 76 f. (Dissertação). Centro de Ciências Agroveterinárias/UEDESC, Lages.

RITZMANN, M.; GRIMM, J.; HEINRITZI, K.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**, New York, v. 133, n.1-2, 2008.

ROCHA, C. S. **Detecção de parvovírus suíno em material proveniente de porcas com patologias reprodutivas**. 2009. 101 f. (Dissertação). Centro de Ciências Agroveterinárias/UDESC, Lages.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHULLER, W.; HEINRITZI, K.; al-NUKTHA, S.; KÖLBL, S.; SCHUH, M. Serologic progression studies using CF and ELISA for detection of antibodies against *Eperythrozoon suis* infection of swine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 103, 1990.

SMOLA, J.; MOLINKOVA, D.; CELER, V. Mycoplasma haemosuis detection by PCR in stillborn fetuses and weak newborn piglets. In: 20th IPVS Congress, 2008, Durban, **Proceedings**...Durban: 2008.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. Eperitrozonose. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Grafica Art, 1999.

SWINE eperythrozoonosis. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, 2004.

THACKER, E. L. **Mycoplasmal diseases**. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine 9th ed**. Ames: Blackwell Publishing, 2006.

USDA. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 13 jun. 2010.

WU, J.; YU, J.; SONG, C.; SUN, S.; WANG, Z. Porcine eperythrozoonosis in China. In: New York Academy of Sciences. **Annals**... New York, v. 1081, 2006.

ZHANG, S.; JU, Y.; JIA, L.; KUMAGAI, S.; LI, J.; MANABE, N. J. Establishment of an efficient enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Eperythrozoon suis* antibody in swine. **Journal of Veterinary Medical Science**. Tokio, v. 70, oct. 2008.

CAPÍTULO III – PERSPECTIVAS

A eperitrozoonose suína tem demonstrado ter uma grande importância em diversos países produtores de suínos, impactando nos custos de produção pela perda direta de animais doentes ou indireta na queda dos índices zootécnicos. O estabelecimento de métodos confiáveis de diagnóstico e o estudo da patogenia e epidemiologia parecem ser uma necessidade para universidades e centros de pesquisa, a fim de juntos conduzirem estudos sobre ferramentas que disponibilizem estas respostas.

Observamos, ao longo da condução do estudo, que ES ainda é subestimada e as poucas ferramentas de diagnóstico, quando presentes, são baseadas em esfregaços sanguíneos de utilização duvidosa e ineficiente. A Disponibilização de métodos seguros, como o Real Time quantitativo, é uma necessidade aos laboratórios que trabalham no setor de produção de suínos.

O trabalho realizado deu mais uma resposta ao projeto de “Doenças da reprodução em suínos” conduzido pela Embrapa Suínos e Aves, porém ficou clara a necessidade de aprofundamento dos estudos sobre este patógeno para se ter o conhecimento de seu impacto epidemiológico na produção industrial do Brasil. A incapacidade do crescimento “in vitro” do agente nos mostra a necessidade de estudarmos a repetibilidade da doença em estudos de infecção experimental para serem estabelecidos o conhecimento genético deste micoplasma, os métodos de tratamento clínico e controle.

REFERÊNCIAS

- ALMOND, G. W. Diseases of the Reproductive System. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine 9th ed.** Ames: Blackwell Publishing, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research Journal**, v. 25, 1997.
- BIONDO, A. W.; DOS SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A. Review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 1-7, jul. set. 2009
- BRONWBACK, A. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. **Vet Med Small Anim Clin**, 76, p. 375-378, 1981.
- DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methods in Cell Biology**. v. 33, 1990.
- FELDER, K. M.; HOELZLE, K.; HEINRITZI, K.; RITZMANN, M.; HOELZLE, L. E.; Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anemia. **BMC Veterinary Research**, 2010.
- GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M. M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L. E. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, 2009.
- GUIMARAES, A. M.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.13, 2007.
- GUIMARÃES, A. M.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v.13, p. 50-53, jan. 2007
- GUIMARAES, A.M.; SANTOS, A.P.; SANMIGUEL, P.; WALTER, T.; TIMENETSKY, J.; MESSICK, J.B. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. **PloS ONE**, v.6, n.5, 2011.
- GUIMARAES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; POLETTO, R.; VEMULAPALLI, R.; SANTOS, A. P.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; SANTOS, L. C.; MARCHANT-FORDE, J. N. ;TIMENETSKY, J.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, 2011.

GWALTNEY, S. M.; HAY, M. P.; OBERST, R. D. detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5,1993.

HEINRITZI, K. The diagnosis o *Eperythrozoon suis* Infection. **Tierarztl Prax journal**. v.18, 1990.

HENDERSON, J. P; O`HAGAN, J.; HAWE, S. M.; PRATT, M. C. H. Anaemia and low viability in piglets with *Eperythrozoon suis* . **Veterinary Record**, v. 140, 1997.

HENRY, S. C. Clinical observations on Eperythrozoonosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 174, 1979.

HOELZLE, K.; GRIMM, J.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; TORGERSON, P.; HAMBURGER, A.; WITTENBRINK, M. M.; HOELZLE, L. E. Detection of antibodies against *Mycoplasma suis* using recombinant antigens and correlation of serological results to hematological findings. **Clinical Vaccine Immunology**, v.14, 2007c.

HOELZLE, K.; DOSER, S.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; PALZER, A.; ELICKER, S.; KRAMER, M.; FELDER, K. M.; HOELZLE, L. E. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. **Vaccine**, v. 27, 2009.

HOELZLE, K.; ENGELS, M.; KRAMER, M. M.; WITTENBRINK, M. M.; DIECKMANN, S. M.; HOELZLE, L. E. *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Veterinary Microbiology**, v. 143, 2009a.

HOELZLE, L. E. Haemotropic micoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v.130, 2008.

_____. Significance of haemotrophic micoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, 120, p. 34-41, 2007a.

HOELZLE, L. E.; ADEL, D.; HOELZLE, K.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M. M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*)in porcine blood. **Veterinary Microbiology**. v. 93, 2003.

HOELZLE, L. E.; HELBLING, M.; HOELZLE, K.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M. M. First Light Cycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, 2007b.

KINSLEY, A. T. Protozoan-like body in the blood of swine. **Veterinary medicine**, v. 27, 1932.

KUCHIISHI, S.; CARVALHO, L. F. O. S.; MACHADO, R. Z. Parasitismo por *Eperythrozoon suis* em suínos de abate. **Anais da ABRAVES**. Artigos científicos, v.2, 2001.

LIMA, E. S. de. **Diagnóstico sorológico de doenças infecciosas causadoras de falhas reprodutivas em suínos**. 2010. (Dissertação). Centro de Ciências Agroveterinárias/UDESC, Lages.

MATOS, M. P. C.; SOBESTIANSKY, J.; RISTOW, L. E. **Eperitrozonose suína**. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone, 2007.

MAYER, M. Über einige bakterienähnliche Parasiten der Erythrozyten bei Menschen und Tieren. **Archiv fuer schiffd-und tropen-hygiene**, v. 68, 1921.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into patohgenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 33, 2004.

MESSICK, J. B; COOPER, S. C.; HUNTLEY, M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11,1999.

MOULDER, J. W. Order I. Rickettsiales. In: Buchanan R.E., Gibbons NE, eds. **Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. Baltimore MD: TheWilliams & Wilki ns Co.1974.

NEIMARK, K. H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii' . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, 2001.

NEIMARK, K. H.; OGAN, K. M. The cell wall-less rickettsia Eperythrozoon wenyonii is a Mycoplasma. **FEMS Microbiology Letters**, v.156, 1997.

OEHLERKING, J.; KUBE, M.; FELDER, K. M.; MATTER, D.; WITTENBRINK, M. M.; SCHWARZENBACH S.; KRAMER. M. M.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E. Complete Genome Sequence of the Hemotrophic Mycoplasma suis Strain K13806. **Journal of Bacteriology**. v. 193, n. 9, 2011.

PEREYRA, N. B; SARRADELL, J. E.; CANE, F. D; FRANCOIS S. E.; PIDONE, C. L.; COMBA E. R.; RODRÍGUEZ, F.; GUGLIELMONE, A. A. Detection of Mycoplasma suis in clinical cases with postweaning multisystemic wasting syndrome in swine. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 38, n. 3, 2006.

PLANK, M.; HEINRITZI, K. Disseminated intravascular coagulation in Eperythrozonosis of swine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 1, n. 103, 1990.

PORTIANSKY E. L.; QUIROGA, M. A.; MACHUCA, M. A.; PERFUMO, C. J. Mycoplasma suis em suínos naturalmente infectados: um estudo ultra-estrutural e morfométrico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, 2004.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, 1997.

RITZMANN, M.; GRIMM, J.; HEINRITZI, K.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**, New York, v. 133, n. 1-2, 2008.

SANTOS, A. P. dos; SANTOS, R. P. dos; BIONDO, A. W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; OLIVEIRA, S. T. de; SÁ GUIMARÃES, A. M. de; TIMENESKY, J.; de MORAIS, H. A.; GONZALEZ, F. H.; MESSICK, J. B.; Hemoplasma infection in HIV- positive patient, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, 2008.

SCHULLER, W.; HEINRITZI, K.; al- NUKTHA, S.; KÖLBL, S.; SCHUH, M. Serologic progression studies using CF and ELISA for detection of antibodies against *Eperythrozoon suis* infection of swine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr** . v. 103, 1990.

SMITH, A. R.; RHAN, T. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, 1975.

SMOLA, J.; MOLINKOVA, D.; CELER, V. *Mycoplasma haemosuis* detection by PCR in stillborn fetuses and weak newborn piglets. In: 20th IPVS Congress, 2008, Durban, **Proceedings**...Durban: 2008.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L. F.; OLIVEIRA, S. Eperitrozoonose. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2. ed. Goiânia: Grafica Art, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I.A.; FREITAS, A.R. Prevalência de rinite atropica e pneumonia em granjas associadas a sistemas de integração de suínos, no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1-2, 1990.

SWINE eperythrozoonosis. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**. v. 40, 2004

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; HARBOUR, D. A.; SAHAW, S. E.; HARRUS, S.; BANETH G.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; BEUFILS, J. P.; BELFORD, C. R.; GRUFFYD- JONES, T. J.; Phylogenetic analysis of *Hemoplasma* species: an international study. **Journa of Clinical Microbiology**, v. 41, 2003.

THACKER, E. L. **Mycoplasmal diseases**. In: STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of Swine 9th ed.** Ames: Blackwell Publishing, 2006.

USDA. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 13 jun. 2010.

VOGL, G.; PLAICKNER, A; SZATHMARY, S.; STIPKOVITS, L.; ROSENGARTEN, R.; SZOSTAK M. P. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. **Infection and immunity**, v. 76, 2008.

WHITEAR, K. L.; BROWNING, G. F. Mycoplasma. In: **Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals**. 3. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2004.

WU, J.; YU, J.; SONG, C.; SUN, S.; WANG, Z. Porcine eperythrozoonosis in China. In: New York Academy of Sciences. **Annals...** New York, v. 1081, 2006.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y.; YUN, S. Prevalence of Eperythrozoon spp. Infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongoli, China. **Epidemiology and Infection**. v. 125, 2000.

YUAN, C. L.; LIANG, A. B.; YAO, C. B.; YANG, Z. B.; ZHU, J. G. Prevalence of Mycoplasma suis (Eperythrozoon suis) infection in swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, 2009.

ZACHARY, J. F.; BASGALL, E. J. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary Pathology**, v. 22, 1985.

ZHANG, S.; JU, Y.; JIA, L.; KUMAGAI, S.; LI, J.; MANABE, N. J. Establishment of an efficient enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Eperythrozoon suis antibody in swine. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokio, v. 70, oct. 2008, p.1143-1145.

ZINN, G. M.; JESSE, G. W.; DOBSON, A. W. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 182, 1983.

ANEXO MEIOS E SOLUÇÕES

DNA

TAMPÃO DE LISE 2 X

Para 100 mL, misturar:

- 4 mL de NaCl 5 M;
- 10 mL de Tris 1 M pH 7,5;
- 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0;
- 5 mL de SDS 20%;
- 77 mL de água ultra pura estéril.
- Estocar temperatura ambiente.

NaCl 5 M

- 116,90 g de NaCl;
- 380 mL de água ultra pura;
- Agitar com barra magnética até entrar em solução;
- Completar com água ultra pura até 400 mL;
- Autoclavar;
- Armazenar a temperatura ambiente.

TRIS 1 M Ph 7,5

- Tris 1 M pH 7,5;
- 48,44 g de Tris Base;
- 350 mL de água ultra pura;
- Misturar com barra magnética até entrar em solução;
- Ajustar pH para 7,5 com HCl concentrado (de 28 a 30 mL);
- Completar volume até 400 mL com água ultra pura;
- Autoclavar 30 minutos a 121°C;
- Estocar a temperatura ambiente.

EDTA 0,5 M Ph 8,0

- 77,44 g de EDTA 2H₂O;
- 300 mL de água ultra pura;
- Medir o pH observando que o EDTA não entra em solução até que atinja pH 8,0, por isso, começar a misturar com barra magnética adicionando NaOH 10 N até chegar a pH 8,0;
- Completar a solução para 400 mL;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Armazenar a temperatura ambiente.

SDS 20%

- 40 g de SDS;
- 150 mL de água ultra pura;
- Aquecer em banho-maria 56°C alguns minutos;
- Misturar com barra magnética até entrar em solução;
- Filtrar em membrana de 0,45 µm;
- Armazenar a temperatura ambiente.

PROTEINASE K

- Deve ser ressuspensa em tampão próprio, seguindo normas do fabricante, de modo a apresentar concentração final de 20 µg/µL.

FENOL EQUILIBRADO

- Descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 mL);
- Adicionar 0,5 g de 8-hidroxyquinoline e misturar;
- Colocar 500 mL de Tris Base 1 M pH 8,0;
- Acrescentar 500 mL da solução de fenol;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Descartar a fase aquosa;
- Colocar o fenol num funil de decantação;
- Adicionar 500 mL de Tris Base 0,1 M;
- Misturar delicadamente;

- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Medir o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,5;
- Distribuir o fenol em frascos de 50 mL (25 mL de fenol e 25 mL de Tris 0,1 mL);
- Armazenar a -20°C .

TRIS BASE 1 M PH 8,0

- 121,14 g de Tris Base;
- 850 mL de água ultra pura;
- Misturar até entrar em solução
- Ajustar o pH 8,0 com HCl concentrado;
- Completar a solução para 1000 mL;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Armazenar a temperatura ambiente.

TRIS BASE 0,1 M PH 8,0

- Fazer diluição 1:10 da solução Tris Base pH 8,0 (100 mL de Tris base 1 M e 900 mL de água ultrapura estéril).

ACETATO DE SÓDIO 3 M PH 5,2

- 163,24 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 98,40 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ anidro;
- 350 mL de água ultra pura;
- Misturar com barra magnética até entrar em solução;
- Ajustar pH com ácido acético glacial (50 mL);
- Completar solução para 400 mL com água ultra pura;
- Autoclavar;
- Armazenar a temperatura ambiente.

ETANOL 75%

- 75 mL de etanol;
- 25 mL de água ultra pura estéril;
- Misturar e conservar a -20°C .

TAMPÃO TE

- 10 mM Tris Base pH 7,5;
- 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0.

TAMPÃO DE CORRIDA gLB (Gel Loading Buffer)

- 0,025 g de Azul de Bromofenol;
- 0,025 g Xileno Cianol;
- 1,5 g Ficol;
- Água Ultrapura até completar 10 mL;
- Dissolver em banho-maria e armazenar a 4°C.

AGAROSE 1%

- 1 g de agarose;
- 100 mL de TBE 0,5X;
- Misturar e aquecer em microndas até a agarose se dissolver;
- Após esfriar, adicionar 5 µL de Brometo de Etídio.

TBE 5 X

- 54 g de Tris base;
- 27,5 g de ácido bórico;
- 20 mL de EDTA 0,5M pH 8,0;
- 900 mL de água ultrapura;
- Agitar com barra magnética até entrar em solução;
- Acrescentar água ultrapura com a quantidade necessária para completar 1 litro;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Estocar em temperatura ambiente.

TBE 0,5 X

- 900 mL de água destilada;
- 100 mL de TBE 5X estéril.

CLONAGEM

SOB (Super Optimal Broth)

Para preparar 50 mL:

- 1,0 g de Bacto Tripton;
- 0,25 g de Bacto Yeast Extract;
- 0,5 mL de NaCl 1 M (1 mL do 5 M);
- 0,125 mL de KCl 1 M (0,5 mL do 250 mM);
- 40 mL de água ultrapura;
- Dissolver por agitação;
- Ajustar pH para 7,0 com NaOH 5 M;
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

SOC (Super Optimal Broth with Catabolite)

Valores para cinco microtubos:

- 4,9 mL de meio SOB;
- 50 µL de magnésio estoque;
- 50 µL de glicose 2 M.

LB (Meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani")

Para preparar 100 mL:

- 1,0 g de Bacto Tripton;
- 0,5 g de Bacto Yeast Extract;
- 0,5 g de NaCl;
- 1,5 g de Ágar Noble.

SOLUÇÃO I

- 5,0 mL de Glicose 2 M (a concentração final ficará 50 mM);
- 2,5 mL de Tris pH 8 1 M (a concentração final ficará 25 mM);
- 2,0 mL de EDTA pH 8 0,5 M (a concentração final ficará 10 mM);
- 100 mL de água ultrapura;
- Autoclavar 15 minutos a 121°C;
- Conservar a 4°C.

SOLUÇÃO II (PREPARAR NA HORA DO USO)

- NaOH 10 N estéril (a concentração final ficará 0,2 N);
- SDS 10% estéril (concentração final ficará 1%);
- Água ultrapura.

SOLUÇÃO III

- 60 mL de Acetato de Potássio 5 M estéril;
- 11,5 mL de Ácido acético glacial;
- 28,5 mL de Água ultrapura;
- Estocar a 4°C.

FENOL EQUILIBRADO

- Descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 mL);
- Adicionar 0,5 g de 8-hidroxyquinoline e misturar;
- Colocar 500 mL de Tris Base 1 M pH 8,0;
- Acrescentar 500 mL da solução de fenol;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Descartar a fase aquosa;
- Colocar o fenol num funil de decantação;
- Adicionar 500 mL de Tris Base 0,1 M;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Medir o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,5;
- Distribuir o fenol em frascos de 50 mL (25 mL de fenol e 25 mL de Tris 0,1 mL);
- Armazenar a -20°C.

ETANOL 75%

- 70 mL de etanol;
- 30 mL de água ultra pura estéril;
- Misturar e conservar a -20°C.

TE COM RNase

- 10 mM Tris Base pH 7,5;
- 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0;
- 1 mg/mL RNase.