

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Mycoplasma Suis HEMOTRÓFICO NO ESTADO DE SÃO
PAULO: EPIDEMIOLOGIA E HEMATOLOGIA**

Nathan da Rocha Neves Cruz
Médico Veterinário

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Mycoplasma Suis HEMOTRÓFICO NO ESTADO DE SÃO
PAULO: EPIDEMIOLOGIA E HEMATOLOGIA**

Discente: Nathan da Rocha Neves Cruz

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Coorientador: Prof. Dr. Luís G. Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária na área de Patologia Animal.

C957m Cruz, Nathan da Rocha Neves
Mycoplasma suis hemotrófico no Estado de São Paulo :
epidemiologia e hematologia / Nathan da Rocha Neves Cruz. --
Jaboticabal, 2019
74 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Coorientador: Marcos Rogério André

1. Suíno. 2. Micoplasmose. 3. Anemia hemolítica. 4. Diagnóstico
molecular. 5. Bacteriologia veterinária. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: *Mycoplasma Suis* HEMOTRÓFICO NO ESTADO DE SÃO PAULO: EPIDEMIOLOGIA E HEMATOLOGIA

AUTOR: NATHAN DA ROCHA NEVES CRUZ

ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA

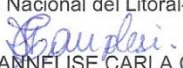
COORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

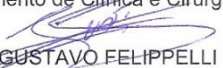
COORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. EDUARDO MATÍAS BELOTTI (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidad Nacional del Litoral-UNL / Santa Fé/Argentina


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GUSTAVO FELIPPELLI
UNIRP / São José do Rio Preto/SP


Prof. Dr. ANDRÉ MARCOS SANTANA
Departamento de Medicina Veterinária-UEM / Umuarama/PR

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2019

DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR

Nathan da Rocha Neves Cruz, Rio de Janeiro, 10 de julho de 1988. Neto de Mercedes Salazar da Rocha, filho de Yara da Rocha Cruz e irmão de Thayane da Rocha Cruz Dias Freitas. Em 2005, concluiu o curso de Técnico Agrícola com habilitação em Zootecnia. Em 2006, ingressou na Universidade de Uberaba – UNIUBE (Minas Gerais) com bolsa integral pelo PROUNI onde graduou-se em Bacharel em Medicina Veterinária. Durante o curso exerceu atividades de monitoria em Ciências Morfológicas com Prof. MSc. Cláudio Yudi Kanayama, em Diagnóstico Laboratorial com Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar e realizou estágio de Iniciação Científica com Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar com quem elaborou o trabalho *“Análise do perfil bioquímico em relação ao Ganho Médio Diário - GMD de bovinos Nelore da linhagem Lemgruber no período do desmame até os 600 dias de idade”* pela FAPEMIG. Por indicação do Prof. Dr. Wanderson Adriano Biscola Pereira realizou seu estágio obrigatório de graduação no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária na UNESP – Jaboticabal (São Paulo). Com essa porta aberta, em 2012 ingressou no Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária (PAP – FUNDAP) sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana concluindo seu Programa de Residência em Patologia Clínica Veterinária em 2014 com a monografia intitulada *“Processo laboratorial: Medidas de Qualidade Adotadas e Laboratório de Patologia Clínica Veterinária”*. Em 2014, ingresso no Mestrado em Medicina Veterinária na área de Patologia Animal pela UNESP – Jaboticabal financiado pelo bolsa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e defendeu sua dissertação *“Influência da anemia ferropriva no eletroforetograma de hemoglobina de leitões”* sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e Prof. Dr. Luís Guilherme Oliveira. Realizou Intercâmbio de Pesquisa na Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional Del Litoral em Santa Fe, Argentina com Prof. 2016, com Prof. Marcelo Ruiz (2016) e Prof. Dr. Hugo Hector Ortega (2019). Em 2016, tornou-se Bolsista de Doutorado pela FAPESP (São Paulo) com o projeto de pesquisa *“Variáveis epidemiológicas e hematológicas da hemoplasiose (M. suis) em suínos criados no Estado de São Paulo”* com orientação do Prof. Dr. Aureo E. Santana e com esse financiamento originou-se esta tese.

“The first symptom noted was depression, which was followed by weakness and dyspnoae; a day or two later icterus and anaemia became apparent. Fever preceded death on the fourth or fifth day of illness.”

Doyle LP. 1932. A Rickettsia-like or Anaplasmosis-like disease in swine. American Veterinary Medical Association. 81: 668-671.

Esta Tese de Doutorado, bem como todos seus frutos são dedicados a Médica Veterinária e Mestre em Medicina Veterinária, *Thaís Gasparini Baraldi*. Por suas mãos, todas as coletas e viagens tornaram-se possíveis.

A presente Tese de Doutorado contou com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por meio do Projeto de Bolsa de Doutorado “*Variáveis epidemiológicas e hematológicas da hemoplasrose (M. suis) em suínos criados no Estado de São Paulo*” e da empresa Ouro Fino Saúde Animal que financiou as viagens para realização das coletas nas granjas que participaram do projeto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a mim que consegui executar, escrever e entregar essa Tese de Doutorado que é o fruto de um lindo Projeto de Doutorado que ajudou a evoluir a forma como eu vejo mundo, a medicina veterinária, o ensino e pesquisa. Muitas pessoas te oferecem oportunidades, conselhos, críticas, ajudas e presentes mas se você não carrega isso contigo e faz acontecer, todas essas propostas foram em vão. Agradeço a mim por multiplicar o olhar e cuidado de pessoas dentro de mim para continuar seguindo em frente o meu viver e trabalho.

A minha família (Mercedes Salazar, Yara Rocha e Thayane Rocha) por entender meus períodos de ausência.

A minha linda família: Karina Tchaina, Andresa Matsui, Demétrio Ian, Aline Kawanami, Mariana Kako. Meu lindo Henrique, eterna Bolota, Brisa, Bimboca, Gatinho Bombom e Tildes.

A minha esposa, Thaís Gasparini Baraldi, um exemplo de superação, força e felicidades. Obrigado por todos os momentos ao teu lado. Esse Tese de Doutorado é sua.

Ao Prof. Marcos Rogério André pela ideia inicial do projeto e por dar apoio para seguir acreditando e lutando por ele.

Ao Prof. Luís Antônio Mathias por me ajudar a redesenhar meu experimento do ponto de vista epidemiológico e me ensinar a ver os dados de forma diferente. Uma inspiração.

Ao Prof. Aureo Evangelista Santana por toda liberdade em executar esse trabalho e confiança em meus atos.

Ao Prof. Luís Guilherme Oliveira pelo apoio ao projeto e contato com os suinocultores.

A minha amiga Helena Cristina Delgado Brito, por seus conselhos e ensinar que apesar no meu tempo, eu posso ter outros tempos.

A Livia Perls e Priscila Ikeda pela ajuda e ensinar a realizar as técnicas moleculares.

Aos Professores de estatística Genner Tadeu, Euclides Braga Malheiros e Antônio Ferraudó pelos ensinamentos de estatística.

A Ana Panosso e Amanda Martinelli por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária por todo apoio nesta trajetória.

Aos membros da banca (Prof. Matías Belotti, Annelise Camplesi, Gustavo Felippelli e André Santana) pelos últimos ajustes neste manuscrito.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento da minha bolsa de Doutorado.

Ao Prof. Wanderson Biscola que um dia me disse que meu futuro estava na UNESP – Jaboticabal. Muito obrigado Prof. pela dica, pela bolsa que financiou o meu estágio curricular nesta Universidade.

Em 2019, encerro um ciclo de especialização (Residência, Mestrado e Doutorado) após minha graduação. Neste agradecimento, quero lembrar de todas as pessoas que cruzaram por mim e que tive a oportunidade de aprender e ensinar. Muito obrigado por cada momento, vocês estão comigo neste momento digitando estas últimas palavras.

Os seus sonhos só morrem se você esquecer de acreditar neles.

SUMÁRIO

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1 Introdução	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	2
1.2.1 Histórico	2
1.2.2 Taxonomia	3
1.2.3 Biologia e Epidemiologia do <i>Mycoplasma suis</i>	4
1.2.4 Patogenia do <i>Mycoplasma suis</i>	5
1.2.5 Sinais clínicos na micoplasmose dos suínos	8
1.2.6 Diagnóstico da micoplasmose dos suínos	9
1.2.7 Profilaxia e tratamento da micoplasmose	10
1.3 REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 – PREVALÊNCIA MOLECULAR DO <i>MYCOPLASMA SUI</i> EM GRANJAS TECNIFICADAS DE CICLO COMPLETO NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.	16
2.1 INTRODUÇÃO	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.2.1 Delineamento amostral	17
2.2.2 Procedimento epidemiológico	19
2.2.3 Seleção dos animais e procedimento de coleta	20
2.2.4 Tempo real quantitativo (qPCR) absoluto para <i>M. suis</i>	21
2.2.5 Procedimento estatístico	23
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
2.4 CONCLUSÃO	33
2.5 REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 3 – CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEL DE BACTEREMIA EM SUÍNOS CRIADOS EM	

GRANJAS DE CICLO COMPLETO NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>MYCOPLASMA SUIS</i>	37
3.1 INTRODUÇÃO.....	37
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.2.1 Delineamento e procedimento amostral	38
3.2.2 Animais e Procedimento de coleta	40
3.2.3 Tempo real quantitativo (qPCR) absoluto para <i>M. suis</i>	41
3.2.4 Análise hematológica.....	43
3.2.5 Procedimento estatístico	43
3.3 RESULTADOS.....	44
3.4 DISCUSSÃO.....	51
3.5 CONCLUSÃO	57
3.6 REFERÊNCIAS	57

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Variáveis epidemiológicas e hematológicas da hemoplasmosse (M. Suis) em suínos criados no Estado de São Paulo**", protocolo nº 11.317/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	09/08/2016 a 01/07/2020
Espécie / Linhagem	Suínos
Nº de animais	900 animais
Peso / Idade	Maternidade, crescimento, terminação
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Granjas do Estado de São Paulo

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

Mycoplasma Suis HEMOTRÓFICO NO ESTADO DE SÃO PAULO: EPIDEMIOLOGIA E HEMATOLOGIA

RESUMO – A hemoplasmose dos suínos, causada pelo *Mycoplasma suis*, caracteriza-se como doença geograficamente cosmopolita, atinge animais de diversas faixas etárias, frequentemente associada à anemia hemolítica moderada a grave e predispõe os animais a imunossupressão, infertilidade, diminuição do ganho de peso, aumento de natimortos, abortos e retorno ao cio, ou seja, impacta diretamente as granjas de suínos e leva a imensuráveis perdas econômicas. Do ponto de vista epidemiológico, animais assintomáticos são considerados como foco da hemoplasmose por serem portadores e apresentarem melhora clínica sem a eliminação do parasita e alguns autores reportam a micoplasmose hemotrófica como uma enfermidade de potencial zoonótico. A prevalência nos rebanhos brasileiros é discutível, especialmente por que o diagnóstico tradicional pela observação do *M. suis* no esfregaço sanguíneo tem baixa sensibilidade. Objetivou-se com o presente trabalho caracterizar a taxa de prevalência e correlacionar a quantidade do *Mycoplasma suis* quantificado por qPCR com alterações nos parâmetros hematológicos em suínos em diferentes fases de criação de granjas tecnificadas de ciclo completo do Estado de São Paulo. Foram avaliadas 20 diferentes granjas suinícolas de ciclo completa situadas em território paulista, foram coletadas 501 amostras de sangue total em EDTA-K2 para análise molecular de qPCR para *Mycoplasma suis* e realização de hemograma e pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo. No primeiro capítulo realizou-se uma revisão de literatura sobre o *Mycoplasma suis*, a patobiologia do agente bem como os sinais clínicos nos animais. No capítulo 2 relatou-se a ocorrência do *Mycoplasma suis* nas granjas tecnificadas de ciclo completo no Estado de São Paulo e foi possível determinar uma prevalência total de animais infectados de 31,93% (161/201) e 95% (19/20) de granjas infectados e por fase de criação foram: creche (30,47%); recria (31,29%), teminação (26,18%) e frigorífico (40,25%). No terceiro capítulo, correlacionou-se os resultados dos parâmetros hematológicos com a bacteremia de *M suis*, sendo que, na comparação dos hemogramas de animais positivos e negativos não houve diferença estatística e ambos os grupos não apresentavam valores alterações em relação aos valores referenciais adotados, situação na qual evidencia-se a condição de animais portadores, aparentemente saudáveis que auxiliam na permanência e propagação do agente nos rebanhos. Nos animais positivos foram observadas correlação entre hemoglobina ($y = 9,978 + 0,186 x$, $p = 0,02$, $r^2=0,354$), plaquetas ($y = 582,522 - 16,190 x$, $p = 0,04$, $r^2 = 0,286$) e neutrófilos ($y = 9,77 - 0,307 x$, $p = 0,05$, $r^2 = 0,276$) com a bacteremia de *M suis*, esses resultados indicam a presença de hemólise, dano vascular e consumo plaquetário inerente aos animais portadores da micoplasmose hemotrófica.

Palavras-chaves: Micoplasmose, Suínos, hemoplasma, prevalência, bacteremia, fases de criação

***Mycoplasma suis* IN THE STATE OF SÃO PAULO: EPIDEMIOLOGY AND HEMATOLOGY**

ABSTRACT – Porcine hemoplasmosis caused by *Mycoplasma suis*, is characterized as a geographically cosmopolitan disease. It affects animals of various age groups, often associated with moderate to severe hemolytic anemia and predisposes the animals to immunosuppression, infertility, decreased weight gain, increased stillbirths, miscarriages and return to heat, that is, directly impacts pig farms and leads to immeasurable economic losses. From an epidemiological point of view, asymptomatic animals are considered as the focus of hemoplasmosis because they are carriers and present clinical improvement without the elimination of the parasite and some authors report hemotrophic mycoplasmosis as a zoonotic potential disease. The prevalence in Brazilian herds is debatable, especially since the traditional diagnosis by observing *M suis* in the blood smear has low sensitivity. The objective of this study was to characterize the prevalence rate and correlate the quantity of *Mycoplasma suis* quantified by qPCR with changes in hematological parameters in pigs in different phases of rearing of full-cycle farms in the State of São Paulo. Twenty different complete cycle swine farms located in the state of São Paulo were evaluated, 501 whole blood samples were collected in EDTA-K2 for molecular analysis of qPCR for *Mycoplasma suis* and blood count and blood smear hemoparasites. In the first chapter there was a literature review on *Mycoplasma suis*, the pathobiology of the agent as well as clinical signs in animals. In Chapter 2, the occurrence of *Mycoplasma suis* was reported in the full-cycle technicated farms in the State of São Paulo and it was possible to determine a total prevalence of infected animals of 31.93% (161/201) and 95% (19/20) infected farms and by growth stages were: nursery (30.47%); growing (31.29%), finishing (26.18%) and slaughter (40.25%). In Chapter 3, the results of the hematological parameters were correlated with the *M suis* bacteremia, and in the comparison of the blood counts of positive and negative animals there was no statistical difference and both groups did not present alterations values in relation to the adopted reference values. This situation evidences the condition of apparently healthy carriers that help in the permanence and propagation of the agent in the herds. In positive animals, a correlation was observed between hemoglobin ($y = 9.978 + 0.186 x$, $p = 0.02$, $r^2 = 0.354$), platelets ($y = 582.522 - 16.190 x$, $p = 0.04$, $r^2 = 0.286$) and neutrophils ($y = 9.77 - 0.307 x$, $p = 0.05$, $r^2 = 0.276$) with *M suis* bacteremia, these results indicate the presence of hemolysis, vascular damage and platelet consumption inherent in animals with hemotrophic mycoplasmosis.

Keywords: Mycoplasmosis, swine, haemoplasma, prevalence, bacteremia, growth stages

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

A hemoplasmose dos suínos, causada pelo *Mycoplasma suis*, caracteriza-se como doença de distribuição geográfica mundial, atingindo suínos em diversos níveis produtivos e está associada à anemia hemolítica severa ou crônica moderada, disgalactia, infertilidade e imunossupressão que podem acarretar prejuízos econômicos.

Por apresentar um complexo mecanismo patogênico, que estabelece um mecanismo de infecção persistente, esta enfermidade pode apresentar três comportamentos clínicos, quais sejam, agudo que é o comportamento clássico com intensa anemia hemolítica, crônico e assintomático.

De acordo com a literatura, os cursos crônicos e assintomáticos da micoplasmose apresentam ampla variedade de condições clínicas quando comparados com o curso agudo da referida doença. Na manifestação aguda, observa-se baixo desempenho dos recém-nascidos, retardo no crescimento e baixa conversão alimentar, podem se confundir com outras enfermidades dos suínos.

Animais portadores assintomáticos da micoplasmose hemotrófica constituem um grande problema dos pontos de vista epidemiológico e econômico, visto que essa condição silenciosa pode perdurar por longos períodos e pode ser mascarada pela instituição de protocolos antibioticoterapêuticos sem a eliminação eficaz do agente, o que contribui para permanência nas granjas.

Além disso, se o agente etiológico é subdiagnosticado ou sua prevalência nos rebanhos é desconhecida, quando há episódios de estresse, dispara o gatilho para multiplicação, levando a bacteremia e anemia devido a imunossupressão temporária.

A prevalência da *M suis* ainda não foi relatada nos rebanhos paulistas e o Estado de São Paulo detém uma particularidade na produção de suínos quando se compara a outros estados produtores como da Região Sul (Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná) e Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul).

Dentro de São Paulo, as criações seguem o sistema integrado e com poucos sistemas de ciclo completo e com produtor médio que busca na suinocultura uma diversificação das atividades produtivas principais.

O ciclo completo é um sistema que envolve todas as fases de produção na mesma propriedade, ou seja, o suíno nasce e permanece na granja até o momento de ser conduzido ao abate (ABCS, 2016).

A suinocultura paulista é formada inteiramente por produtores independentes sem ligação com integradoras ou cooperativas do setor com baixa representatividade em granjas especializadas em pequenas propriedades (sítios), por exemplo, crechários, “wean to finish” ou terminação e com pulverização entre as mesorregiões do Estado (ABCS, 2016).

Com base no cadastro de produtores da Associação Paulista de Criadores de Suínos (APCS, Dados fornecidos, 2016) a maioria das granjas se concentram nas macrorregiões de Campinas, Barretos e Bauru e de acordo com o mapeamento da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS) estas regiões juntas concentram 30% do plantel paulista (APCS, Dados fornecidos, 2016; ABCS, 2016).

Com os olhos nas particularidades da produção de suínos no Estado de São Paulo, bem como na dinâmica do micoplasma hemotrófico dentro da suinocultura paulista, objetivou-se, neste estudo, caracterizar a taxa de prevalência do *Mycoplasma suis*, nas diferentes fases de produção, e analisar o perfil hematológicos dos suínos portadores de micoplasmose hemotrófica no referido Estado.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Histórico

O *Mycoplasma suis* é uma bactéria incultivável, epicelular, com parede celular ausente, sensível à tetraciclina e que se liga à superfície dos eritrócitos causando deformações estruturais (Hoelzle, 2008). Em 1932, Kinsley descreveu partículas semelhantes ao *Anaplasma* spp. ligadas aos eritrócitos em esfregaços sanguíneos de suínos infectados e apresentando hemorragia nos pulmões, coração e rins, esplenomegalia e hepatomegalia com impregnação de bilirrubina, denominando a doença de icteroanemia suína (Splitter, 1950).

Devido às similaridades morfológicas entre o agente da icteroanemia suína e os hemoparasitas conhecidos à época, *Eperythrozoon wenyonii* e *Eperythrozoon ovis*, ele foi denominado *Eperythrozoon suis*, e a doença eperitrozoonose dos suínos (Splitter e

Williamson, 1950). Sendo assim, essa bactéria foi classificada originalmente na ordem Rickettsiales, dentro de dois gêneros, *Eperythrozoon* e *Haemobartonella*.

Com base em recentes estudos filogenéticos e fenotípicos, os hemoplasmas foram reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma* (Rikihisa et al., 1997; Neimark et al., 2002; 2002; Messick et al., 2002; Tasker et al., 2003). De acordo com a classificação molecular atual, tais parasitos foram realocados na ordem Mollicutes, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (Hoelzle, 2008).

1.2.2 Taxonomia

Splitter e Williamson (1950) descreveram a bactéria responsável pela doença observada anteriormente por Doyle (1932) e Kinsley (1932), e nomearam-na de *Eperythrozoon suis*, devido às similaridades morfológicas entre o agente da icterooanemia suína e os parasitos sanguíneos conhecidos à época, *Eperythrozoon wenyonii* e *Eperythrozoon ovis*.

Originalmente a *E. suis* havia sido classificada em duas espécies diferentes, *E. suis* e *Eperythrozoon parvum*, devido a diferenças morfológicas. Posteriormente, houve a unificação destes táxons, pois, se tratavam de espécies homólogas, e as diferenças morfológicas se deviam a diferentes fases de vida, já que o parasita apresenta pleomorfismo (Splitter, 1950; Zachary e Basgall, 1985).

Características como tamanho reduzido, parasitismo eritrocitário e coloração gram-negativa levaram *M. suis* a ser inicialmente descrita como uma bactéria pertencente a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Moulder, 1974). Rikihisa et al. (1997) realizaram o sequenciamento do gene 16S rRNA do *E. suis* e outras duas espécies do gênero *Haemobartonella* (*Haemobartonella muris* e *Haemobartonella felis*), ambos gêneros pertencentes a família Anaplasmataceae.

Os dados obtidos com o sequenciamento, foram comparados entre si, e com outros organismos relacionados por alinhamento de nucleotídeos. Os resultados mostraram uma alta similaridade entre *E. suis* e *Haemobartonella* spp. (acima de 84% de similaridade), sobretudo com *H. felis* (92%), evidenciando um possível parentesco. Além disso, foi observada uma estreita semelhança destes organismos com os do gênero *Mycoplasma* (79 a 83%). Já a semelhança destes organismos com outros membros da família Anaplasmataceae foi relativamente baixa (abaixo de 75%) (Neimark et al., 2001).

Os resultados dos comparativos moleculares mostraram que, ao contrário da classificação anterior baseada em características biológicas e morfológicas, *E. suis* não

pertenceria à família *Anaplasmataceae* ou mesmo à ordem *Rickettsiales*, e estaria mais próxima das outras espécies do gênero *Mycoplasma* (Rikihisa et al, 1997).

Neimark e Kocan (1997), ao realizarem o sequenciamento de outra bactéria hemotrófica, *Eperythrozoon wenyonii*, obtiveram resultados semelhantes, onde *E. wenyonii* se encontrava dentre os micoplasmas, além disso, a similaridade com *H. muris*, *H. felis* e *E. suis* variou entre 80 a 100%.

Baseado na filogenia e sequenciamentos do gene 16S rRNA destas bactérias hemotróficas, propôs-se a reclassificação para o gênero *Mycoplasma*, dentro da família *Mycoplasmataceae*, classe *Mollicute*, instituindo assim o grupo dos hemoplasmas. E com isso, em 2001, *Eperythrozoon suis* teve sua nomenclatura alterada para a atualmente utilizada, *Mycoplasma suis* (Neimark et al, 2001; Johansson et al, 2002; Tasker et al, 2003).

Um segundo micoplasma hemotrófico descrito em porcos é o *Mycoplasma parvum*, antes chamado de *Eperythrozoon parvum*, que teoricamente não é patogênico, mas é próximo filogeneticamente do *M. suis* (Nascimento et al., 2014).

A análise filogenética para o *M. suis* descrita por Guimarães et al. (2011) baseada no 16S rRNA gene (900 bp) é muito próxima do cluster de *M. parvum* de amostras oriundas do Sul do Brasil de matrizes suínas no estudo de (Gatto et al., 2019). Nascimento et al. (2014) relata essas características genômicas compartilhadas que incluem funções metabólicas, transportadores e fatores de virulência putativos (Nascimento et al., 2013; Guimarães et al., 2014).

1.2.3 Biologia e Epidemiologia do *Mycoplasma suis*

M. suis é um pequeno parasita epitelial, que utiliza glicose presente no plasma do hospedeiro para o seu próprio metabolismo (Smith et al., 1990; Gwaltney, 1995). Em estudo genômico, estabeleceu-se que, além de glicose, estas bactérias utilizam outras moléculas do hospedeiro, tais como: inosina, hipoxantina, aminoácidos, nicotinamida, NADH e NADPH (Guimarães et al., 2011; Hoelzle et al., 2014).

Assim como outros hemoplasmas, *M. suis* não apresenta parede celular, organelas e núcleo, com DNA e RNA livres no citoplasma, e reduzido número de genes, os quais codificam somente os produtos essenciais para o suporte da vida (Messick, 2004; Guimarães et al., 2011; Dietz et al., 2016).

Estes organismos são encontrados aderidos à membrana externa dos eritrócitos, provocando danos e deformações (Gwaltney, 1995; Thacker e Minion, 2012) e, também,

livres no plasma, ou intracelularmente, em vacúolos aderidos a membrana eritrocitária interna ou soltos no citoplasma (Groebel et al, 2009).

M. suis possuem morfologia pleomórfica, sendo que no início da infecção predominam as fases imaturas, de formas cocóides, com diâmetro variando entre 0,2 µm e 0,5 µm, e que não causam deformidades as membranas dos eritrócitos nos quais estão aderidos. As fases juvenis, possuem forma de bastonetes ou discóides, com presença de vacúolos intracelulares, e causam as primeiras invaginações nas membranas eritrocitárias (Hoelze, 2014).

No final do ciclo de desenvolvimento surgem as fases maduras do parasita, que causam as maiores alterações estruturais nas membranas eritrocitárias. O diâmetro desta forma varia entre 0,8 µm a mais de 2,5 µm, exibindo áreas centrais extremamente colapsadas, conferindo uma forma anelada (Splitter, 1950; Zachary e Basgall, 1985; Gwaltney, 1995).

A replicação do *M. suis* ocorre com o brotamento de pequenas formas imaturas, de formas imaturas maiores, juvenis ou maduras. As formas imaturas recém-brotadas se aderem adjacientemente à membrana do mesmo eritrócito formando grupos de parasitas, ou em eritrócitos próximos não parasitados (Wu et al., 2006).

Desta forma, em fases de alta bacteremia, é possível encontrar um grande número de organismos em diferentes fases de vida, associados a um mesmo eritrócito (Zachary e Basgall, 1985). O *M suis* tem distribuição cosmopolita e pode estar presente todas as fases de criação de suínos doméstico (*Sus scrofa domesticus*) e outros suídeos (Hoelze et al., 2007; Dias et al. 2019). As prevalências determinadas por biologia molecular podem ser visualizadas no Quadro 1 e demonstram a abrangência geográfica do agente.

1.2.4 Patogenia do *Mycoplasma suis*

A transmissão do *M. suis* pode ocorrer por inoculação subcutânea, intravenosa, intraperitoneal e, em casos de canibalismos ou em soluções de continuidade (ferimentos) na pele causadas por brigas de hierarquia, a absorção pode ser oral (Henry, 1979).

A transmissão indireta pode ocorrer por fômites (seringas e instrumentos cirúrgicos contaminados) (Dietz et al., 2014). Em relação a transmissão vertical, Henderson et al. (1997) afirmava que ela poderia ocorrer via transplacentária, com base nos estudos de Stadler et al. (2019), leitões apresentam positividade e titulação para *M. suis* após o nascimento em amostras coletadas em fazendas na Bavaria, Alemanha. Estes autores

afirmam que a transmissão para os leitões pode ocorrer em duas possibilidades: intrauterina ou por contato no nascimento com secreções vaginas ou sangue contaminados de suas mães.

Quadro 1. Revisão de estudos de prevalência molecular de *Mycoplasma suis* hemotrófico determinados em diferentes lugares do mundo.

PAÍS	CATEGORIA	PREVALÊNCIA (%)	REFERÊNCIA
Coreia do Sul	Suíños – criações tecnificadas	2,9 (55/1867)	Seo et al., 2019
Alemanha Bavaria	Leitões	14,35 (68/474)	Stadler et al., 2019
	Matrizes	23,8 (65/208)	
Brasil Região Sul	Matrizes	79,72 (342/429)	Gatto et al. 2019
Brasil BA, GO e MG	Javali selvagem	50 (7/14)	Dias et al., 2019
Hungria	Javali selvagem	47,1 (8/17)	Hornok et al., 2018
Brasil Maranhão	Criação não tecnificada	54,7 (35/64)	Martins et al., 2018
China	Crescimento	42,4 (101/238)	Fu et al. , 2017
China	Matrizes	70,9 (61/86)	
Brasil Mossoró (RN)	Criação não tecnificada Frigorífico	76,2 (112/147)	Toledo et al, 2016
China	Leitões	13 (39/300)	Song et al., 2014
	Recria	10,8 (100/923)	
	Terminação	25 (190/759)	
	Matrizes de reposição	40,6 (125/308)	
	Matrizes	48,2 (779/1615)	
	Cachaços	44,4 (44/99)	
Japão	Crescimento	5 (6/120)	Watanabe et al., 2012
Japão	Crescimento	50 (6/12)	
Brasil	Matrizes	80 (32/40)	Guimarães et al., 2011
Brasil Foz do Iguaçu, Paraná	Cateto e queixada	0 (0/22)	Guimarães et al., 2011
EUA	Suíños	7,5 (3/40)	Guimarães et al., 2011
Alemanha	Porcos selvagens	10,03 (36/359)	Hoelzle et al., 2009
Alemanha	Crescimento	13,9 (164/1176)	Ritzmann et al., 2009
China	Diversas idades	86 (148/172)	Yuan et al., 2009
Suíça	Matrizes	19 (19/100)	Hoelzle et al., 2007
Alemanha	Crescimento	10,6 (17/160)	Hoelzle et al, 2007

Alguns autores sugerem que o patógeno em questão seja transmitido por meio de vetores, incluindo insetos hematófagos e ectoparasitas, principalmente pelo piolho *Haematopinus suis* (Heinritzi, 1992; Messick, 2004) e por moscas (*Stomoxys calcitrans*) e mosquito ou culicídeos (*Aedes aegypti*), mosquito vetor da dengue, zicavírus e chicungunha (Prullage et al, 1993), entretanto, não existe até o momento estudos que comprovem a presença do *M suis* em ectoparasitas e estudos com transmissão via vetores.

Além disso, foram especuladas rotas alternativas de transmissão de *Mycoplasma suis*, uma vez que, o agente foi detectado em amostras urinárias, swabs de secreções vaginais e nasais e amostras de poeira ambiental, podendo, inclusive, ser transmitido por aerossóis e pela água (Dietz et al., 2014).

Do ponto de vista da patogenicidade, a Micoplasmose é uma infecção persistente, sendo, a anemia o seu sinal clínico evidente (Schweighardt et al, 1989). A adesão ou invasão pelo *M. suis* induz a alterações das hemácias resultando em *eritro-apoptose* culminando com anemia hemolítica severa, fase aguda, ou, cronicamente, anemia moderada; vasculite, devido a danos vasculares, diátese hemorrágica, infertilidade, imunossupressão (Hoelzle, 2008) e resposta inflamatória exacerbada (Hoelzle et al., 2014).

Na fase aguda, caracteriza-se pela presença de anemia hemolítica severa, o *M. suis* induz alterações nas membranas dos eritrócitos, principalmente no citoesqueleto, levando à formação de canais e à indução de eritro-apoptose das células (Hoelzle, 2008; Felder et al., 2011), que se caracteriza pelo processo de morte celular programada de glóbulos vermelhos, que se assemelha à apoptose em células nucleadas (Felder et al., 2011).

Durante a infecção, o patógeno produz radicais livres que levam ao estresse oxidativo da membrana celular hospedeira (Somerson et al., 1965); além disso, os micoplasmas utilizam nutrientes e precursores biossintéticos para o seu metabolismo, podendo levar ao esgotamento e danos às células parasitadas (Russel, 1966; Messick, 2004).

A ocorrência deste mecanismo patogênico está relacionada com a virulência do isolado da amostra e da fase de infecção. Felder et al. (2011) relataram que em porcos infectados com amostras altamente virulentas, a eritro-apoptose é regulada positivamente, porém esta não controla a infecção.

Em contrapartida, porcos infectados com amostras de baixa virulência apresentavam alta taxa de eritro-apoptose e, ainda assim, a sintomatologia era leve, com leve anemia, e valores hematológicos inalterados; portanto, acredita-se que a alta frequência desse mecanismo regularia o curso da infecção (Busser et al., 2008).

Além destas interações (adesão e invasão) entre o agente patogênico e os eritrócitos, levarem à destruição direta das células, ocorre também a hemólise extravascular, principalmente no baço e fígado, devido à fagocitose por macrófagos (eritrofagocitose), incluindo o sequestro esplênico de células deformadas ou alteradas pela bactéria (Zachary e Smith, 1985; Groebel et al., 2009; Hoelzle et al., 2014).

Já, na resposta inflamatória exacerbada, esta reação pode estar associada ao fato de alguns micoplasmas produzirem superantígenos, que são capazes de se ligarem às

moléculas do sistema imune sem que sejam destruídos, assim, desencadeiam uma resposta de estimulação de um grande número de linfócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, porém, havendo uma supressão potencial destas células e levando ao desenvolvimento de sintomas debilitantes, como a artrite crônica (Cole e Alkins, 1991).

Como os micoplasmas hemotrópicos tem potencial para invasão intracelular, como um de seus mecanismos patogênicos, este fato possibilita a evasão do sistema imune do hospedeiro, isto é, além de utilizar as respostas imunes para seus benefícios nutricionais, também podem reduzir a eficácia da utilização de antibióticos (Groebel et al., 2009). Tal fato, esses mecanismos podem justificar a maior ocorrência crônica da enfermidade (Messick, 2004).

1.2.5 Sinais clínicos na micoplasmose dos suínos

As primeiras descrições dos sinais clínicos e lesões feitas por Kinsley (1932) classificavam a doença como uma icteroanemia, pois apresentava manifestações clínicas como icterícia, sangue mais fluido, hemorragia de órgãos vitais; tais como pulmões, rins e coração, espleno e hepatomegalia.

A hemoplasmose suína pode apresentar três fases clínicas: aguda, crônica e subclínica, em cuja fase os sinais clínicos não são característicos (Hoelzle, 2008). Na fase aguda há intensa bacteremia, anemia hemolítica severa (fatais para leitões e porcas gestantes), quadros hipoglicêmicos e morte.

Ademais, há relatos de sinais como dispneia, enterite, fezes com impregnação biliar, cianose e necrose gangrenosa das orelhas (Smith, 1992; Messick, 2004). Já, na fase crônica, a infecção nos suínos é manifestada pela anemia, leve icterícia, baixo desempenho e retardo no crescimento (Henry, 1979; Brownback, 1981; Zinn et al., 1983; Schweighardt et al., 1986). Nas fêmeas, a manifestação aguda pode resultar em depressão, anorexia, estado febril, comportamento materno fraco e, até mesmo, diminuição da produção de leite; e quando associada a problemas reprodutivos, pode ocorrer diminuição da eficiência reprodutiva, incluindo estro tardio ou anestro, morte embrionária precoce e abortamentos (Messick, 2004).

Os suínos podem tornar-se portadores crônicos do *M. suis*. Do ponto vista epidemiológico e econômico, tal fato caracteriza-se como um grande problema, visto que os animais são assintomáticos por meses e em alguns casos podem não apresentar qualquer sintomatologia clínica (Messick et al, 2002).

Esta fase também compreende animais que tiveram melhora clínica induzida por antibioticoterapia sem a eliminação eficaz do parasita (Gresham et al., 1994). Outro fator é o subdiagnóstico da enfermidade pelos métodos laboratoriais, situação que perpetua a hemoplasmose nos rebanhos (Strait et al., 2012).

Thacker e Minion (2012) asseveram que a ocorrência de sinais clínicos, repentinamente, nas fases crônica e assintomática decorre-se pelo estresse ou práticas inadequadas de manejo, visto que, a imunossupressão predispõe à multiplicação do agente e bacteremia no animal portador.

A imunodepressão também associada ao aumento da ocorrência de doenças entéricas e respiratórias em suínos, podendo assim, agravar o quadro do animal e eventualmente a doença pode se manifestar como surtos clínicos, podendo aumentar a frequência em rebanhos infectados, principalmente, quando há ruptura da relação entre a bactéria e o hospedeiro (Zachary e Smith, 1985; Thacker e Minion, 2012; Fard, 2014)

1.2.6 Diagnóstico da micoplasmose dos suínos

O diagnóstico está baseado nos sinais manifestados no plano clínico, bem como no uso das mais variadas modalidades de investigação laboratorial, sendo os testes hematológicos e sorológicos bem usuais (Thacker e Minion, 2012), e de importância na identificação de animais portadores, a fim de eliminá-los do rebanho, e para realização de testes de triagem para prevenir a introdução de animais infectados em rebanhos negativos (Messick, 2004).

O diagnóstico das infecções por *M. suis* é frequentemente fundamentado na observação microscópica de esfregaços sanguíneos corados, porém trata-se de pesquisa laboratorial de baixa sensibilidade e especificidade (Hoelzle et al., 2007).

A sorologia por meio de “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) pode ser empregada para diagnóstico, mas a falta de cultivo e purificação do *M. suis* são fatores que limitam a difusão da técnica (Schuller et al., 1990; Hsu et al., 1992; Hoelzle, 2007b). Na literatura há relatos da utilização de Fixação de Complemento (Splitter, 1958; Baljer et al., 1989; Schuller et al., 1990) e Hemaglutinação Indireta (Smith e Rahn, 1975).

Porém, uma limitação da técnica de Hemaglutinação indireta ocorre pelo fato de mensurar anticorpos IgM, produzidos durante a infecção por *M. suis* e mais direcionados às células danificadas do que ao antígeno propriamente dito. Assim, estes anticorpos

podem tornar-se variáveis e até indetectáveis, portanto, dificultam o diagnóstico por esta técnica (Heinritzi, 1990; Schuller et al., 1990).

Já os métodos moleculares por PCR e qPCR são os mais efetivos para o diagnóstico de micoplasmas hemotróficos, mostrando-se altamente sensíveis, específicos, principalmente para a identificação, dentro da criação, de animais que são portadores (baixa bacteremia) ou que possuem a forma subclínica da doença, e apresentando baixo risco de contaminação e reprodutibilidade (Hoelzle, 2008).

1.2.7 Profilaxia e tratamento da micoplasmose

Devem ser utilizadas medidas profiláticas e de controle juntamente com o tratamento, para evitar a disseminação do agente através de boas práticas de manejo (Messick et al., 2004).

Hoelzle et al. (2009) afirma que a transmissão iatrogênica (p. ex. agulhas), pode ser evitada utilizando-se agulhas novas ou desinfetadas por porca e leitegadas, assim como outros instrumentais cirúrgicas.

Exames sorológicos ou de preferência por conta da alta sensibilidade e especificidade a metodologia de qPCR na aquisição de novos animais na granja para a evitar a introdução do agente no rebanho ou para descartar animais portadores da *M suis* (Fard et al., 2004).

Para o tratamento da infecção aguda, o medicamento de escolha é a oxitetraciclina na dose de 20-30 mg/kg de peso. Não estão disponíveis vacinas contra esta enfermidade no mercado, devido à dificuldade de cultivo da bactéria e aos poucos conhecimentos sobre sua virulência. Entretanto, existe experimentos para desenvolvimento de vacinas com proteínas recombinantes, exemplo disso é o estudo de Hoelzle et al. (2009) que trabalhou com imunogenicidade e eficácia de uma adesina imunodominante do *M. suis* (MSG1) que se estimulou forte imunidade humoral e celular com indução de anticorpos funcionalmente ativos.

Como terapia de suporte pode ser feito um tratamento parenteral, visto que os animais não se alimentam adequadamente, e aplicações de ferro para auxiliar na recuperação da anemia e, ocasionalmente, regredir a mortalidade (Straw et al., 2006).

1.3 REFERÊNCIAS¹

ABCS 2016: **Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, Mapeamento da suinocultura brasileira**. Brasília: SEBRAE-DF, 2016, p. 146-149.

Baljer G, Heinritzi K, Wieler L. 1989. Indirect hemagglutination for *Eperythrozoon suis* detection in experimentally and spontaneously infected swine. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**. 36: 417-423.

Brownback A. 1981. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**. 76: 375-378.

Busser EV, Mateusen B, Vicca J, Hoelzle LE, Haesebrouck F, Maes D. 2008. *Mycoplasma suis* infection in suckling pigs on a Belgian farm. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. 78: 182-186.

Cole BC, Alkins CL. 1991. The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen, MAM: a model superantigen. **Immunology Today**. 12: 271-276.

Dias GB, Amaral RB, Gatto IRH, Lopera IM, Oliveira LG, Hoppe EGL, Machado RZ, André MR. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 63: 94-96.

Dietz S, Lassek C, Mack SL, Ritzmann M, Stadler J, Becher D, Hoelzle K, Riedel K, Hoelzle LE. 2016. Updating the proteome of the uncultivable hemotrophic *Mycoplasma suis* in experimentally infected pigs. **PROTEOMICS**. 16: 609-613.

DOYLE LP. 1932. A rickettsia-like or anaplasmosis-like disease in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 81: 668-671.

Fard RMN, Vahedi SM, Mohammadkhan F. 2014. Haemotropic mycoplasma (hemoplasmas): a review. **Internacional Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. 2: 1484-1503.

Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE. 2011. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. **Cells Physiology and Biochemistry**. 27: 557-564.

Fu Y, Shi T, Xu L, Wei W, Lu F, Zhang X, Yuan X, Li J, LV J, Fang W. 2017. Identification of a novel *Hemoplasma* species from pigs in Zhejiang province, China. **Journal Veterinary Medicine Science** 79: 864-870.

Gatto IRH, Sonálio K, Amaral RB, Morés N, Costa OAD, André MR, Oliveira LG. 2019. **High frequency and molecular characterization of porcine hemotrophic mycoplasmas in Brazil** 231: 33-39.

Gresham A, Rogers J, Tribe H, Phipps LP. 1994. *Eperythrozoon suis* in weaned pigs. **The Veterinary Record**. 134: 71-72.

Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, Hoelzle LE. 2009. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. **Infection and Immunity**. 77: 576-584.

¹ Normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus Jaboticabal, atualizado em 2018.

- Guimarães AMS et al. 2011. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal Applied Microbiology** 111: 417-425.
- Guimarães AMS, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. 2007. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **The Veterinary Record**. 13: 1-4.
- Guimarães AMS, Santos AP, Sanmiguel P, Walter T, Timenetsky J, Messick JB. 2011. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma suis* and Insights into Its Biology and Adaption to an Erythrocyte Niche. **PLoS ONE**. 6: 195-204.
- Guimarães AMS, Santos AP, Nascimento NC, Timenetsky J, Messick JB. 2014. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. **PLoS ONE**. 9: e91445
- Gwaltney SM. 1995. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: clinical syndromes and diagnosis. **Swine Health and Production**. 3: 25-27.
- Heinritzi K. 1990. The diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection. **Tierärztliche Umschau**. 18: 477-481.
- Henderson JP, O'Haga J, Hawe SM, Pratt MCH. 1997. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. **The Veterinary Record**. 8: 144-146.
- Henry SC. 1979. Clinical observations on Eperythrozoonosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 174: 601-603.
- Hoelzle K, Grimm J, Ritzmann M, Heinritzi K, Torgerson AH, Wittenbrink MM, Hoelzle LE. 2007a. Use of Recombinant Antigens To Detect Antibodies against *Mycoplasma suis*, with Correlation of Serological Results to Hematological Findings. **Clinical and Vaccine Immunology**. 14: 1616-1622.
- Hoelzle LE, Helbling M, Hoelzle K, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. 2007b. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**. 70: 346-354.
- Hoelzle LE, Hoelzle K, Felder KM, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. 2007c. MSG1, a surface localized protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. **Microbes and infection (Institut Pasteur)**. 9: 466-474.
- Hoelzle LE. 2008. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**. 130: 215-226.
- Hoelzle K et al. 2009. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. **Vaccine**. 27: 5376-5382.
- Hoelze K, Engels M, Kramer MM, Wittenbrink MM, Dieckmann SM, Hoelzle LE. 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Veterinary Microbiology** 143: 405-409.
- Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. 2014. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. **The Veterinary Journal**. 202: 20-25.

- Hornok S et al. 2018. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary. **BMC Veterinary Research**. 14.
- Hsu FS, Liu MC, Chou SM, Zachary JF, Smith AR. 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine. **American Journal of Veterinary Research**. 53: 352-354.
- Johansson KE, Tully JG, Neimark H, Rikihisa Y. 2002. Revision of haemotrophic Mycoplasma species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52: 683–683.
- Kinsley AT. 1932. Protozoan-like body in the blood of swine. **Veterinary Medicine International**. 27: 196.
- Martins MSS et al. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in extensive pig production systems in the State of Maranhão, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 28: 306-309.
- Messick JB, Walker PG, Raphael W, Berent L, Shi X. 2002. '*Candidatus* mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., '*Candidatus* Mycoplasma haemolamae' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52: 2002.
- Messick JB. 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**. 33: 2-13.
- Moulder JW (1974) Order I. Rickettsiales. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. p.882–890.
- Nascimento NC, Santos AP, Chu Y, Guimarães AMS, Pagliaro A, Messick JB. 2013. Genome Sequence of *Mycoplasma parvum* (Formerly *Eperythrozoon parvum*), a Diminutive Hemoplasma of the Pig. **American Society for Microbiology**. 6: 1-2.
- Nascimento NC, Santos AP, Chu Y, Guimarães AMS, Baird AN, Weil AB, Messick JB. 2014. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. **Veterinary Research**. 45: 86.
- Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. 2002. Revision of haemotrophic Mycoplasma species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 52: 683.
- Neimark H, Kocan KM. 1997. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. **FEMS microbiology letters**. 156: 287–291.
- Prullage JB, Williams, RE, Gaafar, SM. 1993. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology** 50: 125-135.
- Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, Suto C, Shibata S, Futohashi M. 1997. 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**. 35: 823-829.

- Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. 2008. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**. 13: 84-91.
- Russel WC. 1966. Alterations in the nucleic acid metabolism of tissue culture cells infected by mycoplasmas. **Nature**. 212:1537–1540.
- Schuller W, Heinritzi K, Al-nuktha S, Kölbl S, Schuh M. 1990. Serologic progression studies using CF and ELISA for the detection of antibodies against *Eperythrozoon suis* infection of swine. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. 103: 9-12.
- Schweighardt H, Pechan P, Lauermann E, Krassnig G. 1989. *Mycoplasma capricolum* infection in alpine ibex (*Capra ibex ibex*)-a case description. **Kleintierpraxis**. 34: 297-299.
- Smith AR, Rahn T. 1975. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection in swine. **American Journal of Veterinary Research**. 36: 1319-1321.
- Seo M, Kwon O, Kwak D. 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of hemoplasma species in domestic pigs in Korea. **Parasites Vectors**. 12:378.
- Somerson NL, Purcell RH, Taylor-Robinson D, Chanock RM. 1965. Hemolysin of *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal Bacteriology**. 89:813–818.
- Song Q et al. 2014. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. **Preventive Veterinary Medicine** 117: 215-221.
- Splitter EJ. 1950. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., two new blood parasites of swine. **Science**. 111: 513-514.
- Splitter EJ. 1958. The complement-fixation test in diagnosis of eperythrozoonosis in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 132: 47-49.
- Stadler J, Willi S, Ritzmann M, Eddicks M, Ade J, Hoelzle K, Hoelzle LE. 2019. Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a veterical transmission. **Veterinary Research**. 15:252.
- Strait EL, Hawkins PA, Wilson WD. 2012. Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 241: 1666-1667.
- Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., & Taylor, D. J. (2006). Diseases of swine 9 th edition. Diseases of Swine 9th Edition, 701-718.
- Tasker S et al. 2003. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. **Journal of Clinical Microbiology**. 41: 3877-3880.
- Thacker EL, Minion FC (2012) Mycoplasmosis. In: Zimmerman JJ et al. **Diseases of swine**. Iowa: John Wiley & Sons, p. 779-797.
- Toledo MA, Leite AI, Gonçalves LR, Sousa KCM, Amaral RB, Silva GCP, Machado RZ, André MR. 2016. High occurrence of *Mycoplasma suis* infection in swine herds from non-technified farms in Mosoró, state of Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 25: 414-417.

Watanabe Y, Fujihara M, Suzuki J, Sasaoka F, Nagai K, Harasawa R. 2012. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. **Jornal Veterinary Medicine Science**. 74: 1315-1318.

Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. 2006. Porcine eperythrozoonosis in China. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1081: 280-285.

Yuan CL et al. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal Veterinary Research** 70: 890-894

Zachary JF, Basgall EJ. 1985. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary Pathology**. 22: 164-170.

Zachary JF, Smith AR. 1985. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. **American Journal of Veterinary Research**. 46: 821-830.

Zinn GM, Jesse GW, Dobson AW. 1983. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 182: 369-371.

CAPÍTULO 2 – PREVALÊNCIA MOLECULAR DO *MYCOPLASMA SUIS* EM GRANJAS TECNIFICADAS DE CICLO COMPLETO NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL².

2.1 INTRODUÇÃO

A hemoplasmose dos suínos, causada pelo *Mycoplasma suis*, possui uma distribuição geográfica mundial, atingindo suínos em diversos níveis produtivos e é associada à anemia hemolítica severa ou crônica moderada, disgalactia, infertilidade e imunossupressão que podem acarretar prejuízos econômicos (Messick, 2004; Hoelze et al., 2014).

Do ponto de vista epidemiológico, os animais assintomáticos são considerados como principal foco de infecção da hemoplasmose, por serem portadores do agente sem o desenvolvimento clínico ou apresentam melhora clínica sem a eliminação do parasita, contribuem para a permanência nos rebanhos acarretando prejuízos econômicos silenciosos e persistentes (Wu et al., 2006).

A prevalência nas granjas brasileira ainda é discutível, visto que a maioria dos trabalhos se destinam no relato de soroprevalência e prevalência molecular em matrizes (Guimarães et al., 2007; Guimarães et al., 2011; Gatto et al., 2019), em criações extensivas com baixo grau de tecnificação (Toledo et al., 2016; Martins et al., 2019), em porcos selvagens (Dias et al., 2019) e em porcos de cativeiro (Viera et al., 2011).

Existem poucos estudos que se dedicam no conhecimento da presença do *M suis* entre as fases de criação de creche a terminação, bem como, a distribuição geográfica do parasita nas diferentes regiões brasileiras.

O presente estudo teve como objetivo estimar a prevalência por reação de polimerase quantitativa (qPCR) do *Mycoplasma suis* em granjas tecnificadas de ciclo completo no Estado de São Paulo, Brasil.

² Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à Veterinary Microbiology e encontra-se em avaliação para publicação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal (FCAV – UNESP), sobre o protocolo nº 11.317/16.

2.2.1 Delineamento amostral

Com base no cadastrado de associados pela Associação Paulista de Criadores de Suínos (APCS) (APCS, Dados fornecidos, 2016) foram indicadas 41 granjas de ciclo completo situadas em diversas regiões do Estado de São Paulo que possuíam aproximadamente 80.000 animais.

Das 41 granjas existentes, 20 aceitaram participar da pesquisa, desta maneira, não foi possível obter uma amostra probabilística. O presente estudo e os pesquisadores responsáveis não possuem carácter de autoridade sanitária e a adesão ao projeto foi voluntária por parte dos produtores após apresentação do projeto e delineamento experimental.

Alguns produtores não aderiram ao projeto com alegações de manutenção da biosseguridade da granja com visita dos pesquisadores ou devido a suspensas das atividades de criação durante o período da amostragem. A população-alvo nessas 20 granjas paulistas era composta por 37.670 animais, entre os quais se procurou aplicar metodologia de seleção probabilística.

O tamanho da amostragem de cada estabelecimento seguiu a fórmula de estimação de prevalência proposta por Thrusfield (2007) onde se considerou uma prevalência estimada de 50%, uma vez que, as literaturas disponíveis não apresentavam a mesmas condições de criação zootécnica, foi aplicado a seguinte fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 P_{exp} (1 - P_{exp})}{d^2}$$

Onde:

n = quantidade de amostras necessárias

P_{exp} = prevalência estimada

d = limite de precisão absoluta

Para a determinação do número de animais investigados em cada fase de criação dos plantéis, foi utilizada a fórmula que considera a sensibilidade (S) como grau de confiança da amostragem de animais dentro do rebanho e que os falsos positivos foram identificados com um teste confirmatório (Cannon e Roe, 1982; Martin et al. (1992); Noordhuizeen et al., 1997).

$$N = [1 - (1 - C)^{\frac{1}{(D \times S)}}] \times \left[\frac{M - (D \times S - 1)}{2} \right]$$

Onde:

N = Amostragem necessária ou animais que precisão ser investigados

C = grau de confiança do teste utilizado

D = número de unidades com doença / infecção (prevalência estimada)

S = Sensibilidade do teste

M = número de unidades (animais ou rebanho) a ser estudado

Na obtenção da amostra, contemplaram-se as quatro fases de criação que estratificavam a população-alvo em: creche (21 – 65 dias), recria (66 – 110 dias), terminação (111 – 160 dias) e frigorífico (170 – 190 dias). Com o objetivo de padronizar as coletas e uniformizar a idade dos animais coletados foram consideradas o ponto médio de dias para cada fase: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigoríficos (180 dias).

O número de unidades (M) foi inquérito ao produtor no momento da coleta onde ele informava o tamanho do plantel por fase de criação. Ao final, foram coletadas um total de 2256 amostras de sangue.

Para o cálculo do tamanho da amostra necessária para determinação da prevalência empregou-se a fórmula abaixo, que já embute a correção de acordo com o tamanho da população estimada. O cálculo foi realizado por meio do software Epi Info.

$$n = \frac{N * p * q * Z^2}{(N - 1) * E^2 + p * q * Z^2}$$

n = tamanho da amostra a ser examinada

N = tamanho da população-alvo

p = prevalência esperada = 0,35 (35%)

q = 1 – prevalência esperada (0,65)

$Z \cong 1,96$ (nível de confiança = 95%)

E = erro admitido (0,05 ou 5%)

A aplicação da fórmula resultou em um tamanho de amostra no mínimo 348 animais. Uma vez que havia disponibilidade de recursos laboratoriais, foram examinadas 501 amostras. Para manutenção amostral buscou-se uma proporção de animais em cada fase para não distanciar da proporção representada da fase na população-alvo. Foram assim examinadas 128 amostras de animais de creche, 121 de recria, 64 de terminação e 188 de frigorífico.

Ademais, houve uma distribuição da amostra em relação as mesorregiões do Estado de São Paulo seguidas pelo Instituto Geográfico e Cartográfico do Estado (IGB – Governo de São Paulo, 2019). A distribuição de amostras estratificadas por granjas e animais pelas mesorregiões paulistas podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas estratificadas pela quantidade de granjas e animais existentes e examinadas para determinação da prevalência do *Mycoplasma suis* hemotrófico em relação as mesorregiões do Estado de São Paulo.

MESORREGIÃO	GRANJAS		ANIMAIS	
	EXISTENTES	EXAMINADAS	EXISTENTES	EXAMINADOS
1- Araçatuba	1	1	2.200	23
2- Barretos	2	1	5.050	75
3- Bauru	3	1	1.090	15
4- Campinas	14	6	2.110	27
5- Araraquara-Central	3	3	11.550	155
6- Ribeirão Preto	4	4	7.150	95
7- Sorocaba	11	4	8.520	111
TOTAL	41	20	37.670	501

2.2.2 Procedimento epidemiológico

Para análise epidemiológica dos dados foram adotadas as seguintes medidas: a) considerando toda a população; b) uma análise independente por fase de criação; e c) uma análise para cada região do estado. Dessa forma, foi calculado um peso para a análise geral, análise de cada fase e outro a análise por região.

Considerou-se a granja como a unidade primária de amostragem, exceto na análise por região nas situações em que todos os rebanhos da região foram examinados, ou em que apenas um rebanho foi examinado; nesse caso, considerou-se o animal como a unidade primária de amostragem. Na análise geral e na análise por região foi adotada a estratificação segundo a fase de criação.

Para calcular a taxa de prevalência de animais infectados obteve-se o peso que cada animal amostrado representava na população. Para isso determinou-se inicialmente a

probabilidade de seleção de cada animal da amostra, de acordo com a fórmula abaixo (Dohoo et al., 2009).

$$\frac{n}{N} * \frac{m}{M}$$

Nessa fórmula:

n = número de granjas amostradas

N = número de granjas na população

m = número de animais amostrados na granja

M = número de animais na granja

O peso do animal foi calculado como sendo o inverso da probabilidade de seleção, ou seja, $1/[(n/N)*(m/M)]$. Dessa forma, o peso significa o número de animais que o animal amostrado representa.

Outra informação inquerida dos criadores foram a quantidade de matrizes suínas da propriedade com objetivo de conhecer o tamanho da granja pela sua possibilidade de produção a partir das reprodutoras, como uma medição indireta. Esses dados foram aplicados em fórmula de intervalos de classe com objetivo de agrupar as granjas considerando seu tamanho de produção.

2.2.3 Seleção dos animais e procedimento de coleta

Para seleção de animais hígidos para as coletas inicialmente foram determinadas análise de temperatura corporal, auscultação pulmonar e cardíaca, estado comportamental e tempo de perfusão capilar de mucosas (TPC). Entretanto, devido o tempo de deslocamento dos pesquisadores até granja, viabilidade da amostra para serem realizados os testes laboratoriais, estresse pela manipulação durante o procedimento de coleta e recepção dos criados aos procedimentos de pesquisa, optou-se por considerar apenas TPC e estado comportamental normal para atestar a higidez dos animais coletados. Evitou-se animais que não se movimentavam nas baias ou animais que ficavam próximos de baias de enfermos.

Todos os animais amostrados tiveram amostras coletadas por venopunção da veia jugular direita e as amostras foram acondicionadas em tubos a vácuo separados, estéreis e tratados com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K2) com inibidor de DNA/RNase para determinação molecular do *Mycoplasma suis*.

As amostras de sangue total foram transportadas em caixas isotérmicas com refrigeração ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal (FCAV-UNESP) onde foram aliquotadas separadamente em criotubos RNA/DNA free e armazenadas a -20°C até a realização dos procedimentos de biologia molecular no Laboratório de Imunoparasitologia (FCAV-UNESP).

2.2.4 Tempo real quantitativo (qPCR) absoluto para *M. suis*

Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (*Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) (Bustin et al., 2009).

A extração de DNA foi realizada com sangue total de suínos usando o protocolo descrito por Kuramae-Izioka (1997). As mensurações da concentração de DNA das amostras foram realizadas por meio de espectrofotometria com o auxílio do equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo FisherScientific®, Wilmington, Estados Unidos), absorbância de 260/280 nm para determinação de concentração do DNA, tendo como fator de exclusão de amostras aquelas que não atingiram a pureza de 1,8 a 2,0 para realização da técnica de PCR. Com a intenção de descartar a possibilidade de ocorrência de falso-negativos na PCR em tempo real para *M. suis* e atestar a qualidade do procedimento da extração do DNA amostral, todas as amostras extraídas foram submetidas à uma PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') que flanquearam um fragmento de 437 pares de base (pb) do gene GAPDH (gene endógeno).

A técnica da PCR adotada foi a proposta por Birkenheuer et al. (2003) modificada, sendo que, a reação de amplificação utilizou uma reação de volume total final de 25µL (5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,75mM de Cloreto de Magnésio, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase Platinum, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL), com submissão térmica e tempo de amplificação de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 a uma corrente de 90V / 50mA durante 90 minutos. Os produtos amplificados foram comparados com um marcador de peso molecular de 100 pares de base, e os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (Chemi-Doc, Bio-Rad®) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Image Lab, Bio-Rad®).

As amostras de DNA extraídas e positivas na PCR convencional para o gene endógeno GADPH foram submetidas a qPCR baseada no gene 16S rRNA para *Mycoplasma suis*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-CCCTGATTGTACTAATTGAATAAG-3') e R (5'-GCGAACACTTGTTAAGCAAG-3') e a sonda de hidrólise TaqMan (5'-FAM-TGRATACACAYTTCAG-MGBNFQ3') descrito por Guimarães et al., 2011.

As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador modelo CFX 96 (BioRad®), utilizando volume total final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação adotado foi: 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58,5°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos.

Para o procedimento de quantificação do número de cópias de DNA das amostras, foram realizadas diluições seriadas com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/µL a $2,0 \times 10^0$ cópias/µL) para estabelecer uma curva padrão e estas também foram consideradas como controles positivos da reação. Como controle negativo nas reações de qPCR utilizou água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. do mix qPCR descrito.

O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula ($(Xg/\mu L \text{ DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23} \times \text{cópias do plasmídeo}/\mu L$). O número de cópias alvo /µL foi calculado com base em 100% de eficiência de extração de DNA. As eficiências de amplificação foram calculadas a partir da inclinação da curva padrão em cada corrida com base na seguinte fórmula: $E = \frac{10^{-1}}{\text{Inclinação}}$ (Bustin et al., 2009).

Todas as amostras positivas ou com uma leitura inespecífica foram repetidas em triplicada conforme preconizado com guidelines do grupo MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009).

2.2.5 Procedimento estatístico

Os dados foram tabulados em software Microsoft Excel® (Windows, 2010) e as análises epidemiológicas utilizaram o recurso “Complex Sample Frequencies” do software EpiInfo™ 7.7.2.16. (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2018). Para o cálculo do intervalo de confiança da proporção de granjas com animais infectados adotou-se o método de Wilson (Trhusfield, 2007).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo de detecção molecular de *M. suis* considerando a presença do agente nas mais diferentes fases de produção e distribuição geográfica dentro do Estado de São Paulo. Apesar de não haver uma adesão de todos os proprietários, nosso estudo possui uma importante amostragem sobre a presença do *Mycoplasma suis* dentro do sistema produtivo tecnificado paulista.

Com base no censo produtivo da Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS, Dados coletados, 2016) as mesorregiões paulistas de Bauru (12%), Campinas (14%), São José do Rio Preto (14%), Sorocaba (10%) e Macro Metropolitana – São Paulo (16%) concentram o plantel paulista.

Do cadastro de produtores de 41 granjas de ciclo completo disponibilizado pela Associação Paulista de Criadores de Suínos (APCS, Dados fornecidos, 2016), as mesorregiões que têm mais produtores, são: Campinas (12/24 – 29,3%), Sorocaba (10/41 – 24,4%), Ribeirão Preto (5/41 – 12,2%), Araraquara-Central, Barretos e Bauru com 7,3% (3/41), sendo que, a relação das granjas pode ser visualizada na Tabela 2.

Somente 20/41 (48,8%) granjas cadastradas aceitaram participar, as quais distribuiu-se da seguinte forma: Araçatuba (1/20 – 5%); Araraquara-Central (2/20 – 10%); Barretos (2/20 – 10%); Bauru (1/20 – 5%); Campinas (5/20 – 25%); Ribeirão Preto (5/20 – 25%); e, Sorocaba (4/20 – 20%).

Foram coletadas 501 amostras de sangue total e todos os animais não apresentavam alterações comportamentais ou clínicas nas observações dos pesquisadores. Após a extração de DNA, a determinação de positivos para *M suis*, bem

como sua quantificação, baseou-se em uma eficiência de 100% da extração, visto que todas as amostras foram positivas para o GAPDH (gene endógeno).

As amostras foram processadas em 21 placas diferentes com eficiência de reação (E) que variou entre 93,1 – 105% (Tabela 3). Após a triagem das amostras suspeitas positivas, elas foram quantificadas por triplicatas.

Foram utilizadas 12 placas para determinação da quantidade de cópias de *M. suis*, sendo que, a eficiência da reação (E) variou de 93,6 – 105% e coeficiente de correlação (R^2) entre 0,931 – 0,995 (Tabela 4).

Houveram algumas que amostras não puderam ser quantificadas devido ao efeito de Monte-Carlo, que se trata de uma limitação da técnica, quando a amostra apresenta baixo número de cópias de DNA (Bustin et al., 2009). Essas amostras foram repetidas em triplicada e caso não fossem quantificáveis, foram consideradas positivas não quantificáveis.

A média de ciclos de quantificação (C_q) das placas foi de 8,89 – 37,76 e número de cópias de *M. suis* teve uma variação de $1,36 \times 10^1$ – $7,5 \times 10^9$. Em uma das amostras, a maior quantificação foi de $2,23 \times 10^{10}$ cópias de *M suis* por μL de sangue.

A técnica de qPCR utilizada neste estudo possui alta sensibilidade e especificidade conforme padronizada por Guimarães et al. (2011) e amplamente reproduzida por outros autores Toledo et al. (2016), Dias et al. (2019), Gatto et al. (2019), Martins et al. (2019).

Tabela 2. Relação de granjas de suínos de ciclo completo cadastradas na Associação Paulista de Criadores de Suínos (APCS) com respectiva localização por Mesorregiões Administrativas do Estado de São Paulo (IGB – Governo de São Paulo, 2019) e aderência à coleta experimental do presente trabalho. N. Indica recusa do criador por motivos de biossegurança ou inatividade zootécnica durante período; S. Autorização de coleta.

GRANJA	MESORREGIÃO PAULISTA [†]	CIDADE	PARTICIPAÇÃO
1	Araçatuba	Andradina	S
2	Araraquara – Central	Brotas	N
3	Araraquara – Central	Descalvado	S
4	Araraquara – Central	São Carlos	S
5	Assis – Marília	Tupã	N
6	Assis – Marília	Taquarituba	N
7	Barretos	Monte Azul Paulista	N
8	Barretos	Bebedouro	S
9	Barretos	Colina	S
10	Bauru	Bauru	N
11	Bauru	Presidente Alves	N
12	Bauru	Arealva	S
13	Campinas	Bragança Paulista	N
14	Campinas	Casa Branca	N
15	Campinas	Espírito Santo do Pinhal	N
16	Campinas	Holambra	N
17	Campinas	Indaiatuba	N
18	Campinas	Mogi-Mirim	N
19	Campinas	Itupeva	N
20	Campinas	Águas da Prata	S
21	Campinas	Bragança Paulista	S
22	Campinas	Holambra	S
23	Campinas	Leme	S
24	Campinas	Monte A. do Sul	S
25	Ribeirão Preto	Ipuã	S
26	Ribeirão Preto	Cristais Paulista	S
27	Ribeirão Preto	Patrocínio Paulista	S
28	Ribeirão Preto	Córrego Rico	S
29	Ribeirão Preto	Guariba/Taiúva	S
30	São José do Rio Preto	Neves Paulista	N
31	São José dos Campos	Jambeiro	N
32	Sorocaba	Boituva	N
33	Sorocaba	Araçoiaba da Serra	N
34	Sorocaba	Capela do Alto	N
35	Sorocaba	Itararé	N
36	Sorocaba	Paranapanema	N
37	Sorocaba	Ibiúna	N
38	Sorocaba	Capivari	S
39	Sorocaba	Cerqueira César	S
40	Sorocaba	Iaras	S
41	Sorocaba	Itu	S

[†]Mesorregiões determinadas pelo Instituto Geográfico e Cartográfico do Estado (IGB – Governo de São Paulo, 2019).

Tabela 3. Parâmetros da reação do ensaio de qPCR de *Mycoplasma suis* baseado no 16S rRNA gene extraído no DNA de sangue de suínos de granjas do Estado de São Paulo.

Identificação da Reação	E	R ²	Slope	y-int
1-040319	104	0,992	-3,815	34,921
1-080319	104,3	0,997	-3,941	35,609
1-130918	104	0,984	-3,23	39,292
1-180419	104,5	0,931	-3,576	32,601
1-220319	96,8	0,965	-3,401	39,986
1-240419	101	0,994	-3,297	39,603
1-250119	104,3	0,994	-3,222	37,794
1-260419	101,8	0,992	-3,279	39,691
1-290419	99,5	0,994	-3,335	39,179
2-040319	105	0,995	-3,95	34,955
2-080319	100,7	0,997	-3,909	34,967
2-130819	93,6	0,964	-3,486	39,23
2-180419	104,4	0,997	-3,446	34,72
2-240419	99,9	0,989	-3,324	40,252
2-250119	101,1	0,978	-3,296	36,885
2-260419	104,8	0,991	-3,211	38,513
2-280119	102,6	0,99	-3,621	37,528
3-080319	105	0,989	-3,009	36,151
3-250119	105	0,999	-3,202	38,721
3-260419	104,9	0,995	-3,211	38,627
4-260419	101,6	0,987	-3,284	37,909

E: eficiência; R²: coeficiente de correlação; Slope: grau de inclinação da curva; e, y-int: intercepto da curva.

Tabela 4. Parâmetros da reação do ensaio de qPCR de *Mycoplasma suis* e quantificação do número de cópias baseado no 16S rRNA gene extraído no DNA de sangue de suínos de granjas do Estado de São Paulo.

Identificação da Reação	E	R ²	Slope	y-int	Mean Cq	Quantification mean
1-130918	104	0,984	-3,23	39,292	NA	0
1-180419	104,5	0,931	-3,576	32,601	28,89	6,81 x10 ³
1-240419	101	0,994	-3,297	39,603	32,96	7,74 x10 ³
1-260419	101,8	0,992	-3,279	39,691	37,76	7,22
1-290419	99,5	0,994	-3,335	39,179	30,06	1,93 x10 ⁴
2-130819	93,6	0,964	-3,486	39,23	35,29	1,36 x10 ¹
2-240419	99,9	0,989	-3,324	40,252	31,61	3,92 x10 ³
2-250119	101,1	0,978	-3,296	36,885	8,89	7,5 x10 ⁹
2-260419	104,8	0,991	-3,211	38,513	29,83	7,81 x10 ⁵
3-080319	105	0,989	-3,009	36,151	32,52	6,27 x10 ³
3-260419	104,9	0,995	-3,211	38,627	30,59	3,82 x 10 ³
4-260419	101,6	0,987	-3,284	37,909	32,19	4,04 x 10 ³

E: eficiência; R²: coeficiente de correlação; Slope: grau de inclinação da curva; e, y-int: intercepto da curva. NA: Amostra positiva, entretanto, não quantificável devido ao Efeito de Monte-Carlo.

Pelo nosso conhecimento, somos o primeiro relato de *M suis* em granjas tecnificadas de ciclo completo no Estado de São Paulo. Na tabela 5 são apresentadas as prevalências em relação aos animais infectados para *Mycoplasma suis*, primeiramente considerando todos animais amostrados (geral) e divididos por fase de criação.

Em nosso estudo, a prevalência de *M suis* em 501 suínos de 20 granjas de ciclo completo foi investigada e encontramos taxa de prevalência nos animais infectados de 31,93% $\pm$ 2,87 (161/501, IC: 25,67 – 37,12%). Em concordância, a prevalência de *M suis* relatada em diversas partes do mundo estiveram entre 31,9% a 86% (Toledo et al., 2006; Yuan et al., 2006; Guimarães et al., 2011; Song et al., 2014; Fu et al., 2017; Gatto et al., 2019; Martins et al., 2019), nosso estudo ficou dentro desses limites.

Tabela 5. Proporção de animais infectados para *Mycoplasma suis* de granjas de suínos de ciclo completo no Estado de São Paulo estratificado a fase de criação: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigorífico (180 dias).

Grupos	Examinados	Positivos	% pos ¹	Tx. Pv. (%) ²	EP (%) ³	IC (%) ⁴	Efeito ⁵
Geral	501	161	32,14	31,39	2,87	25,67 – 37,12	1,918
Creche	128	34	26,56	30,47	1,75	19,15 – 41,80	5,411
Recria	121	36	29,75	31,29	7,49	15,61 – 46,97	3,133
Terminação	64	17	26,56	26,18	6,21	13,19 – 39,17	1,256
Frigorífico	188	74	39,36	40,25	5,29	29,18 – 51,31	2,172

1. Percentual de positivos; 2. Taxa de prevalência considerando o delineamento amostral; 3. Erro padrão; 4. Intervalo de confiança 95%; 5. Efeito do delineamento amostral.

Conforme afirmado por Song et al. (2014), essas variações nas taxas de prevalência são justificadas pela diferença da distribuição geográfica, época de amostragem, delineamento amostral, características referentes a granja (p. ex. tamanho, tecnificação, condições sanitárias e etc.) e fase de criação (Hoelze et al., 2008).

Quando comparado a estabelecimentos suinícolas não tecnificados, a prevalência de animais infectados vistas nesse estudo (31,93%) foi menor daquelas relatadas por Martins et al. (2019) no Maranhão, Brasil (35/64 – 54,7%) e por Toledo et al. (2016) em Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil (112/147 – 76,19%) em fase abate (frigorífico).

Essa diferença deve-se ao fato que as granjas paulistas amostradas eram intensivas-tecnificadas com e acesso a programas nutricionais, instalações adequadas, genética definida e padronização de manejo zootécnico, ao contrário das citadas na literatura que eram extensivas e não tecnificadas.

Yuan et al. (2009) afirma que suinoculturas comerciais que possuem precárias condições zootécnicas-sanitárias promovem boas condições para alimentação de vetores e outras fontes de transmissão e infecção do *M suis*.

Em consideração as fases de criação, nós observamos uma proporção de animais infectados maior na fase de frigorífico $40,25\% \pm 5,29$ (IC: 29,18 – 51,31), seguidos da fase de recria $31,29\% \pm 7,49$ (IC: 15,61 – 46,97) e creche $30,47\% \pm 1,75$ (IC: 19,15 – 41,8) que tiveram taxas semelhantes. E menor taxa de infecção em animais com 140 dias com $26,18\% \pm 6,21$ (IC: 13,19 – 39,17), contudo, esses valores diferiram pelo índice de confiança (IC).

Fu et al. (2017) descreve uma prevalência em suínos de crescimento semelhante a encontra por esse estudo, 42,4% (101/238) na região Zhekiang na China, porém, os autores consideram a faixa etária entre 30 a 120 dias, estratificação que sombreia com as faixas determinadas por esse estudo e que possivelmente corroboram com nossos resultados.

Em matrizes suínas, as taxas de infecção são altas e variam de 79,7 a 80% em amostragem realizados no sul do Brasil (Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (Guimarães et al., 2011; Gatto et al., 2019) bem como na China com base nos estudos de Song et al. (2014) com prevalência de 48,2% nesta categoria.

Nosso experimento não investigou esta fase, porém em Hoelze et al. (2008), concordamos que o *M suis* pode ser transmitido por contado direto em leitões recém-nascidos com matrizes infectadas, que são reservatórios do agente dentro da granja devido alto período de permanência no ciclo produtivo, e assim a enfermidade se alastra a cada leitegada pelo sistema produtivo através de disputas, canibalismo, vetores e etc.

Com base em estudos de soroprevalência estratificados por faixas etárias em granjas tecnificadas na região de Hubei (China), Song et al. (2014) encontrou um aumento da prevalência nos 21 dias (13%) em relação aos suínos com mais de 71 dias, observação que foi encontrada na frigorífico em relação a demais fases.

Com vistas nas prevalências de *M suis* em suínos de granjas pouco tecnificadas na região de Shanghai (China) correlacionadas com faixa etária, sexo e localização estudos por Yuan et al. (2006), apesar da alta prevalência constatada (148/172 – 86%) os autores afirmam que não houve diferença, entretanto, eles não apresentaram as taxas de prevalência pela estratificação etária. Complementando com a ilação de Gatto et al. (2019), as diferenças de prevalências entre as fases podem ser explicadas pelo comportamento crônico da infecção e baixa bacteremia.

Song et al. (2014) encontrou correlação entre a idade e prevalência de animais infectados, sendo assim, nós acreditamos que a estratificação por faixa etária é fundamental para compreensão da micoplasmose hemotrófica. A faixa etária pode ser considerada como uma medida substituta do tempo de exposição ao agente, visto que há uma presença e um aumento da infecção do *M suis* com o estágio de desenvolvimento e

possivelmente os desafios que levam ao estresse, inerentes da criação de suíno, auxiliam em novas infecções e reagudização da enfermidade (Wu et al., 2006; Hoelze, 2008; Song et al., 2014).

Na tabela 6 são apresentadas as prevalências em relação aos animais infectados para *Mycoplasma suis* das granjas amostras em relação divididos por fase de criação. A maioria das granjas teve positividade para *Mycoplasma suis* (19/20 – 95%, IC: 76,39 – 99,11).

Tabela 6. Proporção de granjas com animais infectados para *Mycoplasma suis* de granjas de suínos de ciclo completo no Estado de São Paulo estratificado a fase de criação: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigorífico (180 dias).

Grupo	Granjas		% Positivos	Intervalo de confiança (%) ¹
	Examinadas	Positivas		
Geral	20	19	95,0	76,39 – 99,11
Creche	20	16	80,0	58,40 – 91,93
Recria	20	13	65,0	43,29 – 81,88
Terminação	20	11	55,0	34,21 – 74,18
Frigorífico	20	18	90,0	69,90 – 97,21

1. Intervalo de confiança: 95%.

Quando considera a taxa de positividade das granjas em relação a fase de criação, na terminação e recria houveram menores taxas de positividade, 55% (IC: 34,24 – 74,18%) e 65% (IC: 43,29 – 81,88%). A fase de creche teve uma presença de 80% (IC: 58,4 – 91,93%) e a mais prevalente foi a fase de frigorífico de 90% (IC: 69,90 – 97,21%).

Em comparação com a literatura, Gatto et al. (2019) encontrou positividade em todas as fazendas suinícolas amostras de matrizes na região sul do Brasil (53/53 – 100%). Song et al. (2014), relata 95,65% (66/69) afetadas com a presença do *M suis*. Ainda na China, na região de Shanghai, Yuan et al. (2009) relata que 49% (32/65) tem animais infectados.

Yuan et al. (2009) últimos autores não estratificam a positividade das granjas com a fase de criação, mas justificam que essas diferenças podem estar na metodologia da amostragem, distribuição geográfica e número de cópias do bactéria (bacteremia).

A quantidade das amostras positivas do presente estudo que não foram quantificáveis devido à baixa bacteremia do *Mycoplasma suis* foram a maioria (Tabela 7) e foi dividida por fase de criação sendo: no total 45,3% (73/161); na fase de creche 58,8% (20/34); na recria 57,1% (20/35); na terminação 37,5% (6/16); e, na fase de frigorífico 35,53% (27/76).

A quantificação absoluta do 16S rRNA *M suis* variou foi variável entre as fases de creche ($5,61 \times 10^{-1}$ – $6,08 \times 10^6$), recria ($5,57 \times 10^{-2}$ – $2,23 \times 10^{10}$), terminação ($1,56 \times 10^1$ –

6,13 x10³) e frigorífico (1,32 x10⁻¹ – 1,11 x10⁸). Em Martins et al. (2019), a quantificação absoluta do 16S rRNA *M suis* variou de 1,26x10¹ - 1,77x10⁶ cópias/μL, mostrou valores abaixo que 10³ em 20% das amostras positivas. Na amostragem realizada por Gatto et al. (2019) as bacteremias encontradas (número de copias) também foi variável.

Tabela 7. Resultados de amostras positivas para *Mycoplasma suis* de suínos de granjas de ciclo completo do Estado de São Paulo divididos pelo número de cópias/ μL do agente determinado através da metodologia de reação de polimerase quantitativa (qPCR).

<i>M suis</i> 16S rRNA n.º de cópias/μL DNA	Fase de criação									
	Geral		Creche 45 dias		Recria 90 dias		Terminação 140 dias		Frigorífico 180 dias	
	Bacteremia	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>
NA ^a	73	45,3	20	58,8	20	57,1	6	37,5	27	35,53
10 ⁻¹	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0
10 ⁻²	7	4,3	2	2,9	0	0,0	0	0,0	6	7,9
10 ⁰	23	14,3	5	14,7	2	5,7	0	0,0	16	21,1
10 ¹	17	10,6	2	5,9	3	8,6	4	25,0	8	10,5
10 ²	6	3,7	1	2,9	1	2,9	1	6,2	3	3,9
10 ³	21	13,0	3	8,8	2	5,7	5	31,2	11	14,5
10 ⁴	7	4,3	1	2,9	3	8,6	0	0,0	3	3,9
10 ⁵	2	1,2	0	0,0	1	2,9	0	0,0	1	1,3
10 ⁶	1	0,6	1	2,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10 ⁷	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0
10 ⁸	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	1	1,3
10 ⁹	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10 ¹⁰	1	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	161	100	34	100	35	100	16	100	76	100

a. NA: Amostra positiva não quantificável devido ao efeito de Monte-Carlo.

Guimarães et al. (2011) afirma que quantificação do *M suis* é fundamental para indicar a presença, principalmente, porque a micoplasmose tem sinais clínicos inespecíficos na fase aguda ou reagudização e além disso os níveis de bacteremia podem flutuar ao longo do mês associado a inúmeros fatores que causam estresse nos animais ou na inclusão indiscriminada de antibióticos na alimentação (Wu et al., 2006; Hoelze et al., 2014; Gatto et al., 2019).

Apesar da baixa bacteremia, estes animais positivos podem desempenhar um importante papel de fonte infecção, uma vez que, são portadores crônicos, silenciosos e falsos negativos em esfregaços sanguíneos e PCR convencional (Stadler et al., 2014). Também tal observação em nossos resultados e na literatura, abre uma discussão não apenas se o *M. suis* é um agente de uma enfermidade principal, mas também se ele

colabora para que outros agentes se instalem, como um cofator para enfermidade pulmonares, entéricas ou virais.

A proporção das granjas com animais infectados por fase de criação e mesorregião podem ser consultadas na tabela 8 e 9, respectivamente. Quando se estratificou a proporção de animais infectados em relação a mesorregião constatou-se que em Sorocaba há maior taxa de prevalência, 43,10% $\pm$ 8,25 (IC: 25,13 – 61,07).

A mesorregião que fica no centro do Estado, Araraquara-Central tem uma prevalência de 31,89% $\pm$ 5,71 (IC: 19,97 – 43,81). As regiões de Araçatuba, Barretos, Bauru, Campinas e Ribeirão Preto possuem uma taxa similar que varia de 21,74 a 27,33%. A mesorregião de Araraquara-Central teve uma percentagem de granjas positivas de 83,33% (5/6), as outras mesorregiões tiveram presença geral em todas as granjas amostradas.

Tabela 8. Proporção de animais infectados para *Mycoplasma suis* de granjas de suínos de ciclo completo estratificado pelas mesorregiões no Estado de São Paulo.

Grupos	Examinados	Positivos	% pos ¹	Tx. Pv. (%) ²	EP (%) ³	IC (%) ⁴	Efeito ⁵
Geral	501	161	32,14	31,39	2,87	25,67 – 37,12	1,918
1 - Araçatuba	23	5	21,74	21,74	8,53	3,88 – 39,59	0,941
2 - Barretos	75	24	32,00	27,33	5,14	17,09 – 37,58	0,983
3 - Bauru	15	4	26,67	26,67	6,67	11,99 – 41,34	0,318
4 - Campinas	27	7	25,93	25,93	8,10	9,18 – 42,67	0,887
5 - Araraquara-Central	155	50	32,26	31,89	5,71	19,97 – 43,81	2,316
6 - Ribeirão Preto	95	22	23,16	24,81	4,57	15,73 – 33,90	1,054
7 - Sorocaba	111	49	44,14	43,10	8,25	25,13 – 61,07	3,051

1. Percentual de positivos; 2. Taxa de prevalência considerando o delineamento amostral; 3. Erro padrão; 4. Intervalo de confiança 95%; 5. Efeito do delineamento amostral.

Tabela 9. Proporção de granjas com animais infectados de granjas de suínos de ciclo completo estratificado pelas mesorregiões no Estado de São Paulo.

Grupo	Examinadas	Positivas	% Positivos	Intervalo de confiança (%) ¹
Geral	20	19	95,0	76,39 – 99,11
1- Araçatuba	1	1	100,0	-
2- Barretos	3	3	100,0	-
3- Bauru	1	1	100,0	-
4- Campinas	1	1	100,0	-
5- Araraquara-Central	6	5	83,3	-
6- Ribeirão Preto	4	4	100,0	-
7- Sorocaba	4	4	100,0	-

1. Intervalo de confiança: 95%.

O Estado de São Paulo é dividido em 13 mesorregiões pela Instituto Geográfico e Cartográfico (ICG, 2019), sendo que, o presente estudo conseguiu coletar em 7 mesorregiões que podem ser visualizadas na Figura 1.

O Estado de São Paulo faz fronteira com os Estados brasileiros de: 1. Ao norte e nordeste com Minas Gerais; 2. À leste com o Rio de Janeiro através da mesorregião de São José dos Campos; 3. À sudoeste com o Paraná; e, 4. À oeste e noroeste com Mato Grosso do Sul.

Conforme apresentado, a mesoregião de Sorocaba no sudoeste do Estado, apresentou a maior taxa de prevalência (43,10%) em a relação outras regiões paulistas. Acreditamos que essa observação pode estar ligada ao fato desta região estar ao lado do Estado do Paraná que possui grande atividade suinícola quando comparado a produção paulista.

No último censo realizado pela ABCS (2016), o Estado do Paraná contava com 592 granjas que corresponde 16% da produção brasileira e 6.216.158 cabeças de suínos (IBGE, 2017) e quando se compara comparadas a realidade de São Paulo, relata-se 75 estabelecimentos paulistas (ABCS, 2016) e 1.205.646 cabeças de suínos (IBGE, 2017). Ressalta-se que a fronteira entre esses Estados, principalmente nesta região é seca sem ocorrência rios e acidentes geográficos, fatores que podem facilitar da disseminação do agente.

Assim, como em São Paulo, o estudo da presença do *Mycoplasma suis* é pouco relatado na literatura na região Sul do Brasil, Bordin (2012) relata uma prevalência de 17,5% em matrizes com transtornos reprodutivos no Estado do Paraná e Santa Catarina. Altas prevalências em matrizes são relatadas por Guimarães et al. (2011) e Gatto et al. (2019) ou seja, dados que evidenciam a manutenção do agente na região.

Uma vez inserido no sistema de produção, o sistema de confinamento e alta densidade populacional leva ao contato frequente e próximo que causa altos índices de infecção nos animais (Hoelze et al., 2008).

Nas outras fronteiras paulistas junto as regiões Sul e Triângulo de Minas Gerais e Leste do Mato Grosso do Sul, essas possuem as maiores produções suinícolas dos seus estados com 46% (Regiões Sul/Sudoeste e Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba) e 55% (Região Sudoeste), respectivamente, segundo dados da ABCS (2016) e IBGE (2017). Porém, estas fronteiras são delimitadas por rios e acidentes geográficos, observação que pode justificar a baixa prevalência das regiões paulistas próximas a estes Estados, quando comparado a mesorregião de Sorocaba

Um ponto que pode ser considerado na circulação do *M suis* é a disseminação de porcos selvagens nestas regiões. Dias et al. (2019) evidencia a circulação de *M suis* em porcos selvagens em amostras coletadas na mesorregião de Barretos (7/14 – 50%), perante isso, levanta-se a seguinte hipótese: qual o impacto da relação de suínos em criação tecnificadas com presença de porcos selvagens infectados na região? Já que, os porcos selvagens além de causar diversos impactos ambientais, também, podem facilitar a disseminação de agentes patológicos.

Hoelze et al. (2007) em estudo de prevalência *M suis* em porcos selvagens no sudoeste da Alemanha, afirma que o contato direto entre o porco doméstico em confinamento e porcos selvagens é improvável. Entretanto, o porco selvagem torna-se reservatório da doença e a propagação da doença pode ocorrer por meio de vetores como: piolhos (*Haemotopinus suis*), moscas hematófagas (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos (*Aedes aegypti*) conforme relato por Prullage et al. (1993).

De qualquer forma, nossas observações sobre distribuição espacial do agente podem convocar futuros estudos em relação a presença e comportamento desta enfermidade nos demais estados vizinhos.

2.4 CONCLUSÃO

O presente estudo relatou a ocorrência de *Mycoplasma suis* em granjas tecnificadas de ciclo completo no Estado de São Paulo, Brasil, sendo assim, a prevalência total de animais infectados foi de 31,93% e 95% das granjas infectadas. A taxa de prevalência de animais infectados entre as fases foi de: creche (30,47%); recria (31,29%), terminação (26,18%) e frigorífico (40,25%). E a mesorregião de Sorocaba no sul do Estado teve uma prevalência *M. suis* de 43,10% (49/111).

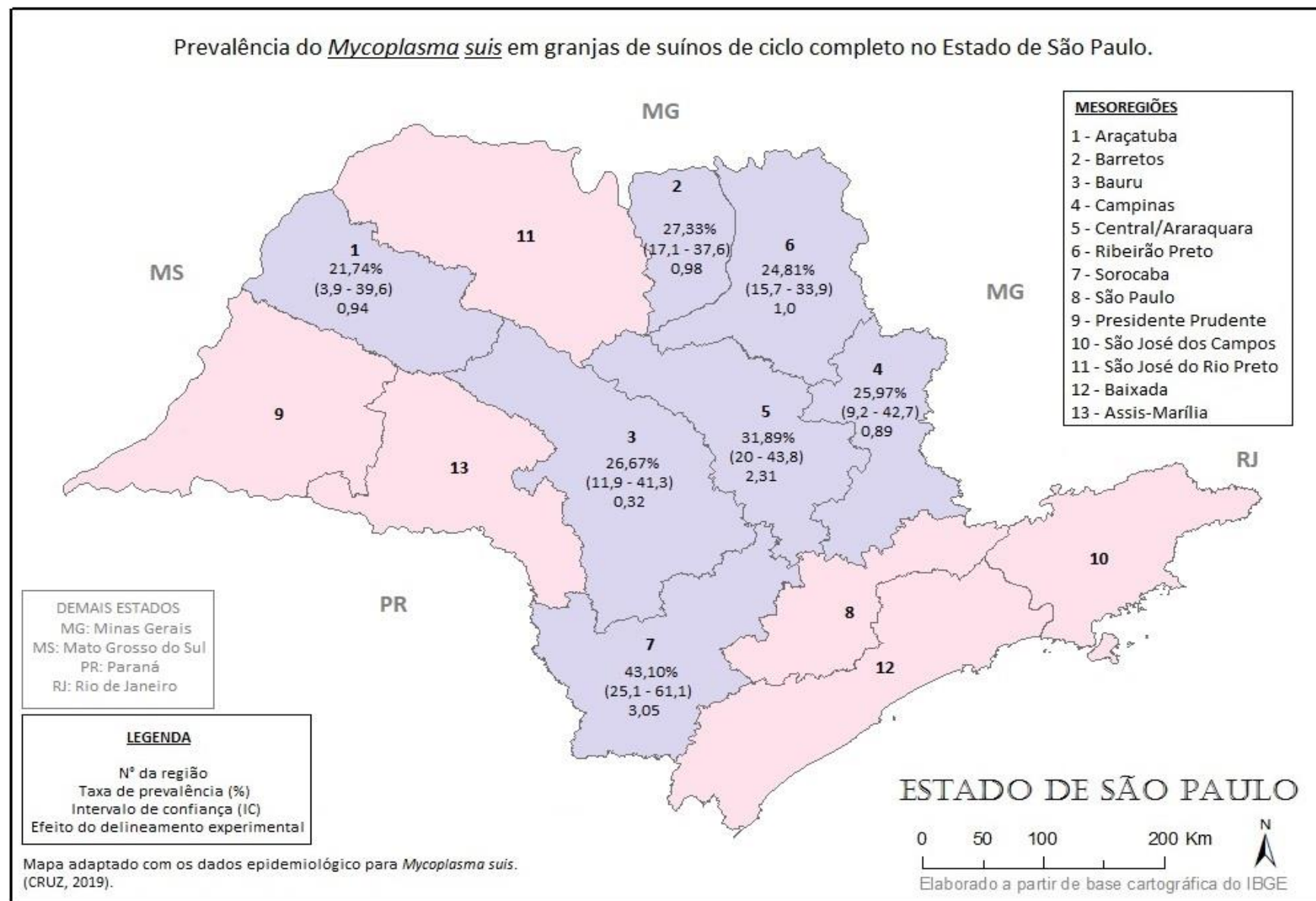


Figura 1. Distribuição geográfica da proporção de animais infectados para *Mycoplasma suis* de granjas de suínos de ciclo completo estratificado pelas mesorregiões no Estado de São Paulo.

2.5 REFERÊNCIAS³

ABCS 2016: **Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, Mapeamento da suinocultura brasileira**. Brasília: SEBRAE-DF, 2016, p. 146-149.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 4172–4177.

Bordin LC (2012). **Detecção do *Mycoplasma suis* em granas com transtornos reprodutivos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UDESC, Lages, Santa Catarina, Brasil, 59 p.

Bustin AS et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry** 55: 611-622.

Cannon RM, Roe, RT. 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Bureau of Animal Health: Camberra, 1982. p. 14-17.

Dias GB, Amaral RB, Gatto IRH, Lopera IM, Oliveira LG, Hoppe EGL, Machado RZ, André MR. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 63: 94-96.

Dohoo I, Marti W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2 ed. VER Inc, 2009, 865 p.

Fu Y, Shi T, Xu L, Wei W, Lu F, Zhang X, Yuan X, Li J, LV J, Fang W. 2017. Identification of a novel *Hemoplasma* species from pigs in Zhejiang province, China. **Journal Veterinary Medicina Science** 79: 864-870.

Gatto IRH, Sonálio K, Amaral RB, Morés N, Costa OAD, André MR, Oliveira LG. 2019. **High frequency and molecular characterization of porcine hemotropic mycoplasmas in Brazil** 231: 33-39.

Guimarães AMS et al. 2011. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal Applied Microbiology** 111: 417:425.

Guimarães AMS, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. 2007. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **Veterinary Records** 160: 50-53.

Hoelze K, Engels M, Kramer MM, Wittenbrink MM, Dieckmann SM, Hoelzle LE. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). 2007. **Veterinary Microbiology** 143: 405-409.

Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. 2014. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. **The Veterinary Journal** 202: 20-25.

Hoelzle LE. Review: Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. 2008. **Veterinary Microbiology**. 130: 215-226.

³ Normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus Jaboticabal, atualizado em 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 2017. Censo agropecuário. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuario.html?=&t=downloads>>. Acesso em: 26 out. 2019.

Instituto Geográfico e Cartográfico – ICG. 2019. Mapas individuais das Regiões Administrativas e Metropolitanas. Disponível em: <http://www.igc.sp.gov.br/produtos/mapas_ra.aspx>. Acesso em: 26 out. 2019.

Kuramae-Izioka EE. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar**. 19: 683–689.

Martin, S. W. et al. 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**. 14: 33-43.

Martins MSS et al. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in extensive pig production systems in the State of Maranhão, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 28: 306-309.

Messick JB. 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potencial. **Veterinary Clinical Pathology** 33: 2-13.

Noordhuizen JPM et al. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers: The Netherlands, p. 50.

Prullage JB, Williams, RE, Gaafar, SM. 1993. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology** 50: 125-135.

Song Q et al. 2014. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. **Preventive Veterinary Medicine** 117: 215-221.

Thrusfield M (2007). Veterinary Epidemiology. Blackwell Publishing, 2007, 610 p.

Toledo MA, Leite AI, Gonçalves LR, Sousa KCM, Amaral RB, Silva GCP, Machado RZ, André MR. 2016. High occurrence of *Mycoplasma suis* infection in swine herds from non-technified farms in Mosoró, state of Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 25: 414-417.

Vieira RFC et al. 2011. Use of a *Mycoplasmas suis*-PCR protocol for screening a population of captive peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 20: 75-77.

Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. 2006. Porcine eperythrozoonosis in China. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1081: 280-285.

Yuan CL et al. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal Veterinary Research** 70: 890-894.

CAPÍTULO 3 – CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEL DE BACTEREMIA EM SUÍNOS CRIADOS EM GRANJAS DE CICLO COMPLETO NATURALMENTE INFECTADOS POR *MYCOPLASMA SUIS*⁴

3.1 INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma suis* possui uma distribuição geográfica mundial, afeta suínos de todas as fases reprodutivas (reprodutores, leitões e animais de engorda) causando anemia hemolítica e hipoglicemia que podem culminar em uma morte aguda pós-infecção (Strait et al., 2012).

A doença pode ter um comportamento diferente dependendo da relação parasita-hospedeiro em relação a virulência do agente e condição imunológica do animal infectado. Alguns animais podem desenvolver a fase subclínica ou crônica caracterizada pela anemia crônica (Messick et al., 2004; Strait et al., 2012).

M suis em comportamento crônico causa diversas síndromes ao longo das fases de produção, como: 1. Aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas entéricas e respiratórias; 2. Falha de crescimento, debilitação e diminuição a tolerância para o estresse; 3. Falha reprodutiva; 4. Irregularidade de cio; 5. Diminuição das taxas de concepção de marrãs e matrizes; 6. Anemia em recém-nascidos e neonatos; 7. Aumento de natimortos; e, 8. Diminuição do ganho de peso (desenvolvimento ponderal) (Gwaltney, 1995; Messick, 2004; Busser et al., 2008; Hoelze et al, 2014) e também contribui para o aparecimento de outras enfermidades.

Esse comportamento crônico da enfermidade gera animais portadores que apresentam níveis mais baixos de bacteremia associado a discretas alterações hematológicas ainda pouco investigadas nesta fase da doença em animais naturalmente infectados. Em eventos de estresse como: nascimento, amamentação, parto e pode ocorrer imunossupressão, gatilho para episódios agudos da micoplasmose (Henderson, 1997; Dent et al., 2013).

Uma vez infectado, o animal se torna portador e o *M suis* se adere na superfície da hemácia, culminando com a hemólise (Groebel et al. 2009). Por meio de inúmeros formas de transmissão se propaga no rebanho gerando prejuízos produtivos e econômicos (Gwaltney, 1995), contudo, pouco descritos e mensurados na literatura.

⁴ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à The Veterinary Journal e encontra-se em avaliação para publicação.

Além disso, a doença tem potencial zoonótico, conforme relatos de Yuan et al. (2009) em trabalhadores de granjas de suínos na China. Segundo Prullage et al. (1993), a transmissão pode acontecer através de vetores como pulgas (*Haematopinus suis*), dípteros (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos (*Aedes aegypti*). O gênero *Mycoplasma* spp, no qual estão incluídos os hemoplasmas como *M suis*, pode atuar como cofator na infecção da HIV (Santos et al., 2008).

A determinação de portadores *M suis* pela metodologia de PCR quantitativa é uma excelente ferramenta para diagnóstico (Dent et al., 2013) e determinação da bacteremia, mesmo com baixo número de cópias (Guimarães et al., 2011) para estudos transversais sobre comportamento hematológico (Ritzmann et al., 2008), impactos produtivos e como ferramenta sanitária para eliminação de animais portadores do rebanho.

Nosso estudo tem como objetivo correlacionar as alterações dos parâmetros hematológicos com a quantificação do número de cópias de DNA de *M suis* em amostras de sangue de suínos de granjas tecnificadas de ciclo completo do Estado de São Paulo, Brasil em diferentes fases de criação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal (FCAV – UNESP), sobre o protocolo nº 11.317/16.

3.2.1 Delineamento e procedimento amostral

Com base no cadastrado de associados pela Associação Paulista de Criadores de Suínos (APCS) (APCS, Dados fornecidos, 2016) foram indicadas 41 granjas de ciclo completo situadas em diversas regiões do Estado de São Paulo que possuíam aproximadamente 80.000 animais.

Das 41 granjas existentes, 20 aceitaram participar da pesquisa. Desta maneira, não foi possível obter uma amostra probabilística. O presente estudo e os pesquisadores responsáveis não possuem carácter de autoridade sanitária e a adesão ao projeto foi voluntária por parte dos produtores após apresentação do projeto e delineamento experimental.

Alguns produtores não aderiram ao projeto com alegações de manutenção da biosseguridade da granja com visita dos pesquisadores ou devido a suspensas das atividades de criação durante o período da amostragem. A população-alvo nessas 20 granjas paulistas era composta por 37.670 animais, entre os quais se procurou aplicar metodologia de seleção probabilística.

O tamanho da amostragem de cada estabelecimento seguiu a fórmula de estimação de prevalência proposta por Thrusfield (2007) onde se considerou uma prevalência estimada de 50%, uma vez que, as literaturas disponíveis não apresentavam a mesmas condições de criação zootécnica, foi aplicado a seguinte fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 P_{exp} (1 - P_{exp})}{d^2}$$

Onde:

n = quantidade de amostras necessárias

P_{exp} = prevalência estimada

d = limite de precisão absoluta

A determinação do número de animais investigados em cada fase de criação dos plantéis, utilizou a fórmula que considerou a sensibilidade (S) como grau de confiança da amostragem de animais dentro do rebanho e que os falsos positivos foram identificados com um teste confirmatório (Cannon e Roe, 1982; Martin et al. (1992); Noordhuizeen et al., 1997).

$$N = [1 - (1 - C)^{\frac{1}{(D \times S)}}] \times \left[\frac{M - (D \times S - 1)}{2} \right]$$

Onde:

N = Amostragem necessária ou animais que precisão ser investigados

C = grau de confiança do teste utilizado

D = número de unidades com doença / infecção (prevalência estimada)

S = Sensibilidade do teste

M = número de unidades (animais ou rebanho) a ser estudado

Na obtenção da amostra, contemplaram-se as quatro fases de criação que estratificavam a população-alvo em: creche (21 – 65 dias), recria (66 – 110 dias), terminação (111 – 160 dias) e frigorífico (170 – 190 dias). Com o objetivo de padronizar as coletas e uniformizar a idade dos animais coletados foram consideradas o ponto médio de dias para cada fase: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigoríficos (180 dias).

O número de unidades (*M*) foi inquérito ao produtor no momento da coleta onde ele informava o tamanho do plantel por fase de criação, ao final, foram coletadas um total de 2256 amostras de sangue.

Para o cálculo do tamanho da amostra necessária para determinação da prevalência empregou-se a fórmula abaixo, que já embute a correção de acordo com o tamanho da população estimada. O cálculo foi realizado por meio do software Epi Info.

$$n = \frac{N * p * q * Z^2}{(N - 1) * E^2 + p * q * Z^2}$$

n = tamanho da amostra a ser examinada

N = tamanho da população-alvo

p = prevalência esperada = 0,35 (35%)

q = 1 – prevalência esperada (0,65)

Z ≅ 1,96 (nível de confiança = 95%)

E = erro admitido (0,05 ou 5%)

A aplicação da fórmula resultou em um tamanho de amostra de 348 animais. Uma vez que havia disponibilidade de recursos laboratoriais, foram examinadas 501 amostras.

Para manter na amostra uma proporção de animais de cada fase que não ficasse muito distante da proporção representada pela fase na população-alvo. Foram assim examinadas 128 amostras de animais de creche, 121 de recria, 64 de terminação e 188 de frigorífico.

3.2.2 Animais e Procedimento de coleta

Para seleção de animais hígidos para as coletas inicialmente foram determinadas análise de temperatura corporal, auscultação pulmonar e cardíaca, estado comportamental e tempo de perfusão capilar de mucosas (TPC). Entretanto, devido o tempo de deslocamento dos pesquisadores até granja, viabilidade da amostra para serem realizados os testes laboratoriais, estresse pela manipulação durante o procedimento de coleta e recepção dos criados aos procedimentos de pesquisa, optou-se por considerar apenas TPC e estado comportamental normal para atestar a higidez dos animais coletados. Evitou-se animais que não se movimentavam nas baias ou animais que ficavam próximos de baias de enfermos.

Todos os animais amostrados tiveram amostras coletadas por venopunção da veia jugular direita e as amostras foram acondicionadas em doias tubos a vácuo, estéreis e

tratados com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-K2) para realização dos hemogramas e nos tubos destinados a determinação molecular do *Mycoplasma suis* adicionou-se inibidor de DNA/RNase (RNAlater™ Stabilization Solution, Thermofisher).

As amostras de sangue total foram transportadas em caixas isotérmicas com refrigeração ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal (FCAV-UNESP) onde foram aliquotadas separadamente em criotubos RNA/DNA free e armazenadas a -20°C até a realização dos procedimentos de biologia molecular no Laboratório de Imunoparasitologia (FCAV-UNESP).

3.2.3 Tempo real quantitativo (qPCR) absoluto para *M. suis*

Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (*Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) (Bustin et al., 2009).

A extração de DNA foi realizada com sangue total de suínos usando o protocolo descrito por Kuramae-Izioka (1997). As mensurações da concentração de DNA das amostras foram realizadas por meio de espectrofotometria com o auxílio do equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo FisherScientific®, Wilmington, Estados Unidos), absorvância de 260/280 nm para determinação de concentração do DNA, tendo como fator de exclusão de amostras aquelas que não atingiram a pureza de 1,8 a 2,0 para realização da técnica de PCR.

Com a intenção de descartar a presença de inibidores nas amostras de DNA extraídas e possibilidade de ocorrência de falso-negativos na PCR em tempo real para *M. suis*, todas as amostras de DNA extraídas foram submetidas à uma PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') que flanquearam um fragmento de 437 pares de base (pb) do gene GAPDH.

A técnica da PCR adotada foi a proposta por Birkenheuer et al. (2003) modificada, sendo que, a reação de amplificação utilizou uma reação de volume total final de 25µL (5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,75mM de Cloreto de Magnésio, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase Platinum, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL), com submissão térmica e tempo de amplificação de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por

desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 a uma corrente de 90V / 50mA durante 90 minutos. Os produtos amplificados foram comparados com um marcador de peso molecular de 100 pares de base, e os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (Chemi-Doc, Bio-Rad®) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Image Lab, Bio-Rad®).

As amostras de DNA extraídas e positivas na PCR convencional para o gene endógeno GADPH foram submetidas a qPCR baseada no gene 16S rRNA para *Mycoplasma suis*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-CCCTGATTGTACTAATTGAATAAG-3') e R (5'-GCGAACACTTGTTAAGCAAG-3') e a sonda de hidrólise TaqMan (5'-FAM-TGRATACACAYTTCAG-MGBNFQ3') descrito por Guimarães et al., 2011.

As reações de amplificação foram realizadas no Termociclador modelo CFX 96 (BioRad®), utilizando volume total final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (IQ Multiplex Power Mix, BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e água ultrapura esterilizada (Nuclease-FreeWater, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação adotado foi: 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 58,5°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos.

Para o procedimento de quantificação do número de cópias de DNA das amostras, foram realizadas diluições seriadas com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/µL a $2,0 \times 10^0$ cópias/µL) para estabelecer uma curva padrão e estas também foram consideradas como controles positivos da reação. Como controle negativo nas reações de qPCR utilizou água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. do mix qPCR descrito.

O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula ((Xg/ µL DNA/ [tamanho do plasmídeo (pb) x 660]) x $6,022 \times 10^{23}$ x cópias do plasmídeo/µL). O número de cópias alvo /µL foi calculado com base em 100% de eficiência de extração de DNA. As eficiências de amplificação foram calculadas a partir da inclinação da curva padrão

em cada corrida com base na seguinte fórmula: $E = \frac{10^{-1}}{\text{Inclinação}}$ (Bustin et al., 2009). Todas as amostras positivas ou com uma leitura inespecífica foram repetidas em triplicada conforme preconizado pelo MIQE Guidelines (Bustin et al., 2009).

3.2.4 Análise hematológica

Das amostras de sangue total tratadas com EDTA foram realizados hemograma por meio de contador automático de células sanguíneas (ABCVet Counter, Horiba, Montpellier, França, 2004), incluindo as seguintes variáveis: contagem de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL), contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

A fórmula leucocitária relativa (FLR) será obtida em esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de May-Grunwald-Giemsa, e estabelecida após contagem de 100 leucócitos, em microscopia de luz. A partir da contagem global dos leucócitos e da fórmula leucocitária relativa, estabelecer-se-á a fórmula leucocitária absoluta (FLA), com a aplicação de uma regra de três simples (cada variedade leucocitária $\times 10^3/\mu\text{L}$) (Thrall, 2012). Além disso, foram realizadas pesquisas para inclusões parasitárias de *Mycoplasma suis* nos eritrócitos dos suínos amostrado.

3.2.5 Procedimento estatístico

Os dados relacionados a determinação da presença do *Mycoplasma suis* foram tabulados em software Microsoft Excel® (Windows, 2010) e as análises epidemiológicas utilizaram o recurso “Complex Sample Frequencies” do software EpiInfo™ 7.7.2.16. (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 2018). Para o cálculo do intervalo de confiança da proporção de granjas com animais infectados adotou-se o método de Wilson (Trhusfield, 2007)

Os valores hematológicos foram tabulados divididos em dois grupos em relação a positividade da para *Mycoplasma suis* 16S rRNA extraído do sangue dos suínos coletados e fase de criação (creche, recria, terminação e frigorífico). Os valores hematológicos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogoroy-Smirnov ($p < 0,05$) e assim foram comparados pelos testes de Tukey ($p < 0,05$) quando paramétricos e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) quando não paramétricos. Por não se tratar de um estudo de infecção experimental, não foram dados *outliers* ou influentes.

Para determinação da correlação e regressão linear entre a quantificação do número de cópias baseado no 16S rRNA do *Mycoplasma suis* que foram submetidos a transformação logarítmica e valores hematológicos por fase de criação (todas, creche, recria, terminação e frigorífico), utilizou-se, teste de Pearson (paramétricos) e Spearman (não paramétricos com grau de confiança de 95% para ambos os testes).

Quando a correlação foi significativa, determinou-se o nível de relação por regressão linear simples, onde, considerou-se a variável independente (x) a quantificação *M suis* e dependente a variável hematológica teste (y).

Os procedimentos estatísticos descritivos, normalidade, teste de médias, correlação e regressão foram realizadas no software R (R Core Team, 2016).

3.3 RESULTADOS

Foram coletadas 501 amostras de sangue total e todos os animais não apresentavam alterações comportamentais ou clínicas. Todas as amostras extraídas de DNA foram positivas para o GAPDH (gene endógeno). As amostras foram processadas em vinte umas placas diferentes com eficiência de reação (*E*) que variou entre 93,1 – 105%. Após a triagem das amostras suspeitas positivas, elas foram quantificadas por triplicatas.

Após a triagem das amostras positivas, estas amostras foram repetidas em triplicada para a determinação da quantidade de cópias de *M. suis* baseado no 16S rRNA, sendo que, a eficiência da reação (*E*) variou de 93,6 – 105% e coeficiente de correlação (R^2) entre 0,931 – 0,995. A média de ciclos (*Cq*) foi de 8,89 – 37,76 e número de cópias de *M. suis* teve uma variação de $1,36 \times 10^1$ – $7,5 \times 10^9$. Em uma das amostras, a maior quantificação foi de $2,23 \times 10^{10}$ cópias de *M suis* por μL de sangue.

Devido ao baixo número de cópias/ μL de DNA do parasita houve amostras que não puderam ser quantificadas, essa foi uma limitação da técnica de qPCR, denominada Efeito de Monte-Carlo (Bustin et al., 2009), e foi também relatado por outros autores que trabalharam com o mesmo agente Guimarães et al. (2011), Gatto et al. (2019) e Martins et al. (2019).

Pelo nosso conhecimento, somos o primeiro relato de *M suis* em granjas tecnificadas de ciclo completo no Estado de São Paulo. Em nosso estudo, a prevalência de *M suis* em 501 porcos de 20 granjas de ciclo completo foi investigada e nós encontramos taxa de prevalência nos animais infectados de $31,93\% \pm 2,87$ (161/501, IC: 25,67 – 37,12%). Na tabela 1 são apresentadas as prevalências em relação aos animais infectados para *M suis*.

Tabela 1. Proporção de animais infectados para *Mycoplasma suis* de granjas de suínos de ciclo completo no Estado de São Paulo estratificado a fase de criação: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigorífico (180 dias).

Grupos	Examinados	Positivos	% pos ¹	Tx. Pv. (%) ²	EP (%) ³	IC (%) ⁴	Efeito ⁵
Geral	501	161	32,14	31,39	2,87	25,67 – 37,12	1,918
Creche	128	34	26,56	30,47	1,75	19,15 – 41,80	5,411
Recria	121	36	29,75	31,29	7,49	15,61 – 46,97	3,133
Terminação	64	17	26,56	26,18	6,21	13,19 – 39,17	1,256
Frigorífico	188	74	39,36	40,25	5,29	29,18 – 51,31	2,172

1. Percentual de positivos; 2. Taxa de prevalência considerando o delineamento amostral; 3. Erro padrão; 4. Intervalo de confiança 95%; 5. Efeito do delineamento amostral.

Das 161 amostras positivas, todas foram quantificadas para a determinação da presença do parasita no sangue total periférico (bacteremia). Nas amostras coletadas por nosso estudo, nós encontramos uma maior quantidade de amostras não quantificáveis devido à baixa bacteremia, além disso, o percentual de amostras foi dividido entre as fases de criação pela n° de cópias/ μ L de DNA e pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 2. Resultados de amostras positivas para *Mycoplasma suis* de suínos de granjas de ciclo completo do Estado de São Paulo divididos pelo número de cópias/ μ L do agente determinado através da metodologia de reação de polimerase quantitativa (qPCR).

<i>M suis</i> 16S rRNA n.º de cópias/ μ L DNA	Fase de criação									
	Geral (n = 161)		Creche 45 dias (n = 34)		Recria 90 dias (n = 35)		Terminação 140 dias (n = 16)		Frigorífico 180 dias (n = 76)	
Bacteremia	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
NA ^a	73	45,3	20	58,8	20	57,1	6	37,5	27	35,53
10 ⁻¹	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0
10 ⁻²	7	4,3	2	2,9	0	0,0	0	0,0	6	7,9
10 ⁰	23	14,3	5	14,7	2	5,7	0	0,0	16	21,1
10 ¹	17	10,6	2	5,9	3	8,6	4	25,0	8	10,5
10 ²	6	3,7	1	2,9	1	2,9	1	6,2	3	3,9
10 ³	21	13,0	3	8,8	2	5,7	5	31,2	11	14,5
10 ⁴	7	4,3	1	2,9	3	8,6	0	0,0	3	3,9
10 ⁵	2	1,2	0	0,0	1	2,9	0	0,0	1	1,3
10 ⁶	1	0,6	1	2,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10 ⁷	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	0	0,0
10 ⁸	1	0,6	0	0,0	1	2,9	0	0,0	1	1,3
10 ⁹	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10 ¹⁰	1	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	161	100	34	100	35	100	16	100	76	100

a. NA: Amostra positiva não quantificável devido ao efeito de Monte-Carlo.

A quantidade das amostras positivas que não foram quantificáveis devido à baixa bacteremia do *Mycoplasma suis* foram de: no geral 45,3% (73/161); na fase de creche

58,8% (20/34); na recria 57,1% (20/35); na terminação 37,5% (6/16); e, na fase de frigorífico 35,53% (27/76). A quantificação absoluta do 16S rRNA *M suis* variou foi variável entre as fases de creche ($5,61 \times 10^{-1} - 6,08 \times 10^6$), recria ($5,57 \times 10^{-2} - 2,23 \times 10^{10}$), terminação ($1,56 \times 10^1 - 6,13 \times 10^3$) e frigorífico ($1,32 \times 10^{-1} - 1,11 \times 10^8$).

Os valores médios, desvio padrão das variáveis hematológicas e resultado das comparações de médias estão nas tabelas 5 e 6 e foram divididas pela infecção por *M suis* e estratificado pelas fases de criação podem ser visualizadas na.

Utilizou-se o valor referencial proposto por Thorn (2012) para interpretação dos resultados hematológicos. As médias encontradas de todos parâmetros hematológicos em ambos os grupos estiveram dentro do valor referencial para suínos.

Houve diferença nos animais da fase de recria (90 dias) entre os grupos negativo e positivo para *M suis* para os parâmetros de leucócitos (Negativo: $16,3 \pm 3,5$; Positivo: $18,2 \pm 4,6$; $p = 0,022$), eosinófilos (Negativo: $0,38 \pm 0,46$; Positivo: $0,55 \pm 0,57$; $p = 0,042$), linfócitos (Negativo: $8,85 \pm 2,75$; Positivo: $10,7 \pm 2,90$; $p = 0,001$) e eritrócitos (Negativo: $6,29 \pm 0,6$; Positivo: $6,54 \pm 0,6$; $p = 0,036$).

Nos animais da terminação (140 dias) houve diferença para os valores de leucócitos (Negativo: $16,6 \pm 3,1$; Positivo: $18 \pm 3,8$; $p = 0,051$) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Negativo: $32,3 \pm 1,6$; Positivo: $31,7 \pm 1,0$; $p = 0,027$) e durante a fase de frigorífico (180 dias) houve diferença nos valores de linfócitos (Negativo: $11,6 \pm 3,4$; Positivo: $10,6 \pm 3,4$; $p = 0,016$), monócitos (Negativo: $0,09 \pm 0,15$; Positivo: $0,18 \pm 0,09$; $p = 0,023$) e CHCM (Negativo: $31,6 \pm 1,9$; Positivo: $32,1 \pm 1,7$; $p = 0,018$).

Em relação à pesquisa de hemoparasitas nas extensões sanguíneas, não foram visualizadas inclusões redondas a ovaladas pericelulares de *M suis* nos eritrócitos dos suínos amostrados.

Nosso estudo conseguiu indicar correlações entre a quantidade de bactérias definidas pelo qPCR nas amostras positivas com alguns parâmetros hematológicos (Tabela 7). Considerando as fases criação juntas, houve significância nos parâmetros de eosinófilos ($p = 0,054$), neutrófilos ($p = 0,048$) e plaquetas ($p = 0,057$).

Na fase de creche, houve correlação nos parâmetros de eosinófilos ($p = 0,0941$), neutrófilos ($p = 0,00874$), hemoglobina ($p = 0,0249$) e hematócrito ($p = 0,0299$). Na fase de recria, os parâmetros de eosinófilos ($p = 0,055$), bastonetes ($p = 0,058$) e plaquetas ($p = 0,040$) que foram significativas.

Na fase de terminação não houveram correlações significativas e na fase de frigorífico (180 dias) apenas o parâmetro de monócitos teve significância em relação ao número de cópias do parasita por μL /amostra ($p = 0,053$).

Dos parâmetros que tiveram correlação foram determinadas a relação por regressão linear para determinar o modelo entre o n.º de cópias/ μL de DNA do 16S rRNA *Mycoplasma suis* (x) e parâmetros hematológicos (y), sendo que, estes modelos estão todos descritos na tabela 8.

O modelo teve significância para apenas para plaquetas quando se considerou todas amostras reunidas, hemoglobina e neutrófilos na fase de creche e na fase de recria apenas os parâmetros de plaquetas e eosinófilos. Em relação ao coeficiente de determinação (r^2), todas as regressões tiveram valores abaixo de 0,5.

Tabela 5. Resultados de leucócitos totais, basófilos, eosinófilos, bastonete, neutrófilos, linfócitos e monócitos de suínos de granjas de ciclo completo do Estado de São Paulo estratificados pela fase de criação (creche, recria, terminação e frigorífico) e agrupados em relação a positividade para *Mycoplasma suis* determinada pela técnica de qPCR.

FASE	<i>M. suis</i> [†]	Leucócitos (x 10 ³ /μL)	Basófilos (x 10 ³ /μL)	Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	Bastonete (x 10 ³ /μL)	Neutrófilos (x 10 ³ /μL)	Linfócitos (x 10 ³ /μL)	Monócitos (x 10 ³ /μL)
Creche (45 dias)	Negativo (n = 94)	18,7 ± 5,7	0,04 ± 0,91	0,30 ± 0,42	0,01 ± 0,06	7,55 ± 3,17	10,7 ± 4,7	0,10 ± 0,19
	Positivo (n = 34)	19,3 ± 5,7	0,01 ± 0,03	0,36 ± 0,82	0,03 ± 0,12	7,63 ± 3,42	11,2 ± 4,7	0,15 ± 0,20
	<i>p</i> ≤ 0,05	0,522	0,182	0,427	0,610	0,985	0,517	0,089
Recria (90 dias)	Negativo (n=86)	16,3 ± 3,5	0,07 ± 0,13	0,38 ± 0,46	0,01 ± 0,06	6,85 ± 2,76	8,85 ± 2,75	0,12 ± 0,21
	Positivo (n = 35)	18,2 ± 4,6	0,05 ± 0,10	0,55 ± 0,57	0,01 ± 0,05	6,80 ± 3,67	10,7 ± 2,90	0,19 ± 0,28
	<i>p</i> ≤ 0,05	0,022	0,543	0,042	0,848	0,369	0,001	0,095
Terminação (140 dias)	Negativo (n = 48)	16,6 ± 3,1	0,04 ± 0,07	0,35 ± 0,39	0 ± 0,22	5,58 ± 2,14	10,4 ± 3,42	0,18 ± 0,29
	Positivo (n = 16)	18 ± 3,8	0,03 ± 0,07	0,52 ± 0,43	0 ± 0	5,86 ± 2,18	11,3 ± 3,29	0,31 ± 0,37
	<i>p</i> ≤ 0,05	0,050	0,912	0,060	0,556	0,553	0,259	0,133
Frigorífico (180 dias)	Negativo (n = 112)	19,8 ± 4,2	0,02 ± 0,07	0,50 ± 0,66	0,02 ± 0,07	7,55 ± 3,7	11,6 ± 3,4	0,09 ± 0,15
	Positivo (n = 76)	19,4 ± 4,5	0,02 ± 0,07	0,37 ± 0,60	0,04 ± 0,11	8,26 ± 2,75	10,6 ± 3,4	0,18 ± 0,09
	<i>p</i> ≤ 0,05	0,410	0,712	0,070	0,131	0,144	0,016	0,023

[†] Comparação de médias realizada pelos testes de Tukey ou Kruskal-Wallis com base no teste de normalidade de Kolmogoroy-Smirnov (*p* ≤ 0,05) e valores de *p* em negrito indicam diferença estatística.

Tabela 6. Resultados de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas dos suínos de granjas de ciclo completo do Estado de São Paulo estratificados pela fase de criação (creche, recria, terminação e frigorífico) e agrupados em relação a positividade para *Mycoplasma suis* determinada pela técnica de qPCR.

FASE	<i>M. suis</i> [†]	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (g/dL)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Creche (45 dias)	Negativo (n = 94)	6,09 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 1,5	36 $\pm$ 5	59,4 $\pm$ 5,8	17,7 $\pm$ 2,2	30,1 $\pm$ 1,3	479 $\pm$ 191
	Positivo (n = 34)	6,13 $\pm$ 0,6	11,3 $\pm$ 1,1	37 $\pm$ 4	60,9 $\pm$ 4,4	18,5 $\pm$ 1,5	30,4 $\pm$ 11,5	487 $\pm$ 115
	$p \leq 0,05$	0,971	0,119	0,288	0,225	0,132	0,192	0,385
Recria (90 dias)	Negativo (n=86)	6,29 $\pm$ 0,6	11,2 $\pm$ 1,0	36 $\pm$ 3,9	56,7 $\pm$ 4,2	18 $\pm$ 1,5	31,6 $\pm$ 1,7	428 $\pm$ 115
	Positivo (n = 35)	6,54 $\pm$ 0,6	11,5 $\pm$ 1,2	37 $\pm$ 4,6	56,2 $\pm$ 4,4	17,7 $\pm$ 1,3	31,5 $\pm$ 1,9	481 $\pm$ 180
	$p \leq 0,05$	0,036	0,301	0,184	0,245	0,133	0,338	0,188
Terminação (140 dias)	Negativo (n = 48)	6,37 $\pm$ 0,7	11,2 $\pm$ 2	36 $\pm$ 4,2	56,5 $\pm$ 3,6	18,2 $\pm$ 1,4	31,7 $\pm$ 1,6	425 $\pm$ 94
	Positivo (n = 16)	6,52 $\pm$ 0,6	11,4 $\pm$ 0,9	36 $\pm$ 2,8	55,3 $\pm$ 2,6	17,5 $\pm$ 1,2	32,3 $\pm$ 1,0	423 $\pm$ 141
	$p \leq 0,05$	0,481	0,724	0,714	0,284	0,096	0,027	0,735
Frigorífico (180 dias)	Negativo (n = 112)	7,67 $\pm$ 0,8	13,7 $\pm$ 1,4	44 $\pm$ 4,7	57,1 $\pm$ 3,1	18 $\pm$ 1,4	31,6 $\pm$ 1,9	401 $\pm$ 108
	Positivo (n = 76)	7,68 $\pm$ 0,8	13,9 $\pm$ 1,9	43 $\pm$ 5,5	56,4 $\pm$ 4	18,1 $\pm$ 1,7	32,1 $\pm$ 1,7	386 $\pm$ 102
	$p \leq 0,05$	0,925	0,285	0,500	0,272	0,765	0,018	0,640

[†] Comparação de médias realizada pelos testes de Tukey ou Kruskal-Wallis com base no teste de normalidade de Kolmogoroy-Smirnov ($p \leq 0,05$) e valores de p em negrito indicam diferença estatística.

Tabela 7. Coeficientes de correlação[†] entre n.º de cópias/µL de DNA do 16S rRNA *Mycoplasma suis* em relação aos valores hematológicos dos suínos de granjas de ciclo completo do Estado de São Paulo estratificados pela fase de criação (creche, recria, terminação e frigorífico).

		<i>Leucócitos</i>	<i>Basófilos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>Bastonetes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>
		Coeficiente						
TODOS		-0,112	0,072	0,206	-0,003	-0,211	0,002	-0,032
	$p \leq 0,05$	0,298	0,503	0,054	0,980	0,048	0,982	0,767
		<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Hematócrito</i>	<i>VCM</i> ¹	<i>HCM</i> ²	<i>CHCM</i> ³	<i>Plaquetas</i>
	Coeficiente	-0,099	0,018	-0,063	0,107	0,112	0,086	-0,204
CRECHE (45 DIAS)	$p \leq 0,05$	0,356	0,865	0,557	0,322	0,299	0,423	0,057
		<i>Leucócitos</i>	<i>Basófilos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>Bastonetes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>
	Coeficiente	-0,381	0,378	0,460	-0,378	-0,666	-0,165	0,153
	$p \leq 0,05$	0,179	0,173	0,094	0,173	0,008	0,573	0,594
RECRIA (90 DIAS)		<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Hematócrito</i>	<i>VCM</i>	<i>HCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>Plaquetas</i>
	Coeficiente	0,420	0,595	0,579	0,178	0,116	0,0304	-0,380
	$p \leq 0,05$	0,129	0,025	0,029	0,542	0,693	0,918	0,180
		<i>Leucócitos</i>	<i>Basófilos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>Bastonetes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>
TERMINAÇÃO (140 DIAS)	Coeficiente	0,264	-0,0619	0,505	0,495	0,0640	0,172	0,422
	$p \leq 0,05$	0,340	0,822	0,055	0,058	0,821	0,593	0,113
		<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Hematócrito</i>	<i>VCM</i>	<i>HCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>Plaquetas</i>
	Coeficiente	0,0516	-0,330	-0,164	-0,285	-0,458	-0,187	-0,535
FRIGORÍFICO (180 DIAS)	$p \leq 0,05$	0,855	0,224	0,560	0,302	0,086	0,504	0,040
		<i>Leucócitos</i>	<i>Basófilos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>Bastonetes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>
	Coeficiente	-0,470	0,121	0,173	-	-0,146	-0,146	-0,253
	$p \leq 0,05$	0,171	0,733	0,633	-	0,688	0,688	0,482
FRIGORÍFICO (180 DIAS)		<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Hematócrito</i>	<i>VCM</i>	<i>HCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>Plaquetas</i>
	Coeficiente	-0,337	-0,204	-0,293	0,237	0,241	0,261	-0,141
	$p \leq 0,05$	0,342	0,571	0,411	0,510	0,467	0,698	0,698
		<i>Leucócitos</i>	<i>Basófilos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>Bastonetes</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>
FRIGORÍFICO (180 DIAS)	Coeficiente	0,0165	-0,0387	0,0283	0,0166	-0,0453	0,0502	-0,278
	$p \leq 0,05$	0,910	0,791	0,846	0,909	0,756	0,731	0,053
		<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemoglobina</i>	<i>Hematócrito</i>	<i>VCM</i>	<i>HCM</i>	<i>CHCM</i>	<i>Plaquetas</i>
	Coeficiente	0,0351	0,0993	0,0611	0,233	0,0954	-0,189	-0,154
FRIGORÍFICO (180 DIAS)	$p < 0,05$	0,810	0,496	0,677	0,107	0,513	0,193	0,290

[†] Teste de correlação realizada pelos testes de Pearson ou Spearmann com base no teste de normalidade de Shapiro-Wilk. ($p < 0,05$); 1. Volume corpuscular médio; 2. Hemoglobina Corpuscular Média; 3. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Valores de p em negrito indicam diferença estatística.

Tabela 8. Determinação da relação entre n.º de cópias/µL de DNA do 16S rRNA *Mycoplasma suis* (x) e parâmetros hematológicos (y) através do ajuste de modelo de regressão linear ($y = a + bx$), grau de significância do modelo ($p \leq 0,05$) e coeficiente de determinação (r^2).

	Parâmetros	$y = a + bx$	$p \leq 0,05$	r^2
TODOS	Plaquetas	$y = 453,04 - 6,75x$	0,02	0,047
	Neutrófilos	$y = 8,16 - 0,10x$	0,09	0,021
	Eosinófilos	$y = 0,31 + 0,01x$	0,22	0,005
CRECHE (45 dias)	Hemoglobina	$y = 9,98 + 0,19x$	0,02	0,354
	Hematócrito	$y = 33,18 + 0,60x$	0,28	0,336
	Eosinófilos	$y = 0,32 + 0,01x$	0,92	0,001
	Neutrófilos	$y = 9,77 - 0,31x$	0,05	0,276
RECRIA (90 dias)	Plaquetas	$y = 582,52 - 16,19x$	0,04	0,286
	HCM†	$y = 17,80 - 0,091x$	0,09	0,210
	Eosinófilos	$y = 0,30 + 0,03x$	0,05	0,255
	Bastonete	$y = -0,004 + 0,004x$	0,14	0,160
FRIGORÍFICO (180 dias)	Monócitos	$y = 0,26 - 0,01x$	0,19	0,035

† HCM: Hemoglobina Corpuscular Média.

3.4 DISCUSSÃO

A prevalência do *Mycoplasma suis* não é amplamente conhecida na suinocultura industrial devido ao agente ser subdiagnosticado nos rebanhos (Strait et al, 2012). No conhecimento dos autores, esse é o primeiro estudo que busca determinar a prevalência e correlação com as alterações hematológicas dos suínos criados em ciclo completo no Estado de São Paulo, Brasil.

O estudo utilizou a técnica de PCR quantitativa para determinar a presença e quantificar o DNA do agente etiológico. A técnica possui alta sensibilidade e especificidade para *M suis* (Hoelzle et al., 2007; Guimaraes et al., 2011) e já foi várias vezes reproduzida por autores anteriores ao nosso estudo Toledo et al. (2016), Dias et al. (2019), Gatto et al. (2019); Martins et al. (2019).

Como encontrado por Gatto et al. (2019), o número de cópias /µL foi variável, sendo que, 20% dos seus resultados ficaram com em 10^3 e os nossos foram em sua maioria positivos não quantificáveis 37,5% a 58,8%, dependendo da fase de criação estudada. Martins et al. (2019) teve uma quantificação absoluta do 16S r RNA *M suis* com variação de $1,26 \times 10^1$ - $1,77 \times 10^6$ cópias/µL e nossos resultados se aproximaram desse relato.

Dent et al. (2013) elucida que muitos animais infectados se recuperam mas continuam a ser portadores com baixos níveis de bacteremia e sinais clínicos ausentes ou geralmente leves com possibilidade de recrudescência de episódios agudos.

A bacteremia variável reside no fato da relação do *M suis* com eritrócito do hospedeiro atacando a superfície da célula ou invadindo o citoplasma e causando uma infecção perniciososa (Fard et al., 2014). Essas bacteremias baixas e não detectadas, levam a perda econômicas significativa na produção de suínos e diminuição no rendimento de carcaça na fase frigorífico, devido a baixo desenvolvimento ponderal (Ritzmann et al., 2008).

Na análise do esfregaço sanguíneo, não houve a visualização dos microrganismos na microscopia. Os esfregaços para avaliar a presença do parasita possuem baixa sensibilidade para detectar a infecção, principalmente, nos suínos que não possuem sinais clínicos (Gwaltney, 1995; Guimaraes et al., 2007).

Apesar de a micoplasmose ser reportada ao redor do mundo ainda há poucos relatos que se dedicam a investigar os valores hematológicos e a prevalência do *M suis*. No conhecimento dos autores esse é o primeiro estudo em larga escala que investiga os valores hematológicos e sua correlação coma prevalência pela metodologia qPCR do *M suis* em suínos de granjas tecnificadas no Brasil considerando as fases de criação.

Nenhum dos suínos amostrados foram considerados anêmico quando comparados aos valores referenciais adotados por nossa investigação. Isso reforça a condição de portabilidade dos suínos, uma vez que, não apresentam como relatados caso de anemia aguda infecciosa por micoplasma ou infecções experimentais onde os suínos apresentam diminuição eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, aumento de bilirrubina total e sem alteração na contagem de leucócitos (Busser et al. 2008; Ritzmann et al 2008) diferença em relação a animais negativos para *M suis* (Hoelze et al., 2007b).

Em nenhuma das fases de criação houve diferença entre animais negativos e positivos para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, observação relatada por Guimarães et al. (2007) e Stephan (2007) que afirmam que esses parâmetros não são sensíveis para indicação de infecção crônica em *M suis*.

Não observamos alterações nos índices eritrocitários, em Stadler et al. (2014), a esse achado em animais com anemia aguda é uma marca registrada de anemia hemolítica, para nós é uma marca de portabilidade do agente etiológico com alterações discretas ou até ausentes na população eritrocitária.

Hoelze et al. (2014) afirma que condição anêmica pode ocorrer em associação com massiva ou mínima bacteremia e ademais a infecção de *M suis* pode resultar em animais

cl clinicamente sadios com condições subclínica ou estado de portador crônico (Dent et al., 2013).

Stadler et al. (2014) em estudos com animais esplenectomizados desenvolvem fase aguda com anemia e quando possuem baço apresentam a fase crônica com ou sem anemia moderada. Dessa forma, a condição experimental realizada por estes autores versa sobre a condição de imunossupressão, crucial na predisposição ao desenvolvimento de diversas doenças que incluem as micoplasmose (Busser et al. 2008).

Episódios fisiológicos de estresse como: lutas por dominância, adaptação a novas fases de criação, partos, transporte, alteração de alimentação, uso indiscriminado de antibióticos e procedimentos cirúrgicos são relacionadas ao reagudização da anemia em animais portadores *M suis* (Hoelzle, 2008; Dent et al., 2013) que reforça o papel silencioso do agente nos rebanhos suínos descrito por Fard et al. (2014).

Nos animais de terminação e frigorífico foram encontradas significância entre os grupos para o parâmetro de CHCM, essas observações podem estar correlacionadas com uma hemólise intravascular nos grupos positivos para *M suis*, visto que, uma das alterações patológicas é a hemólise (Hoelze et al., 2007b) e esses animais tem uma latência do microrganismo mesmo sem causar grandes quadros de anemia hemolítica.

Observou-se na fase de recria, valores significativamente baixos sem caracterização de anemia no grupo positivo o que pode confirmar uma influência do *M suis* e sua bacteremia variável sobre a população eritrocitária (Hoelze et al., 2007b; Ritzmann et al., 2008).

Outra observação foi em relação aos leucócitos, eosinófilos e linfócitos que foram significativamente maiores no grupo positivo ($18,2 \pm 4,6$; $0,55 \pm 0,57$; $10,7 \pm 2,9$) em relação aos negativos ($16,3 \pm 3,5$; $0,38 \pm 0,46$; $8,85 \pm 2,75$). Nos animais positivos existe uma modulação da resposta leucocitária mediada pelos linfócitos frente a infecção pelo *M suis* quando assume um comportamento crônico, ademais, os eosinófilos estão associados a resposta contra ecto e endoparasitas (Zachary e Smith, 1985).

Com base nos nossos resultados, bem como asseverado por Ritzmann et al. (2008), os parâmetros hematológicos não refletem o status de infecção pelo *M suis* e não podem ser usados como indicadores de infecção, já que, estes animais estavam saudáveis, sem sinais clínicos e baixa bacteremia (fase crônica).

O presente estudo identificou correlações entre o índice de presença do *M suis* na corrente sanguínea pela qPCR e os parâmetros hematológicos analisados, contudo, nossos coeficientes de determinação (r^2) foram baixos. Uma explicação para esse achado seria que os animais amostrados são sadios e portadores de *M suis* (Dent et al., 2013),

bacteremia oscilatória que influência no aparecimento dos sinais clínicos (Hoelze et al., 2014) e possibilidade de infecção por uma amostra *M suis* de baixa virulência (Stadler et al., 2014).

Quando se considerou todos os animais amostrados houve correlação nos parâmetros de plaquetas, neutrófilos e eosinófilos, entretanto, na determinação do modelo linear o coeficiente de determinação foi extremamente baixo ou não houve significância no modelo (0,047; 0,021; e, 0,005, respectivamente) que está relacionado ao efeito da amostragem por fase de criação sobre o teste estatístico.

Na fase de creche, apesar hematócrito e eosinófilos terem correlação o modelo não foi significativo ($p = 0,28$; $p = 0,92$, respectivamente). Nesta fase, a hemoglobina ($y = 9,98 + 0,19x$) e neutrófilos ($y = 9,77 - 0,31x$), nossos achados foram relevantes.

A explicação para correlação positiva da hemoglobina está em que quando aumenta-se a presença do *M suis* mais eritrócitos são invadidos que causa lise direta por toxinas e citolisinas, bem como, uma indução na produção de IgM e IgG anti-eritrócitos que desencadeia uma reação autoimune, causando hemólise indireta (Hoelze et al., 2014; Fard et al., 2014; Stadler et al., 2014).

Outra possibilidade de hemólise indireta descrita por Felder et al. (2011) é a eritroptose, quando, o *M suis* de baixa virulência interage com os metabolismos eritrocitários buscando nutrientes (Fard et al., 2014), principalmente a glicose, e a hemácias como uma forma de defesa inicia um processo de morte celular programa com o objetivo de impedir uma progressão da infecção, contudo, esse mecanismo, todavia não está bem elucidado.

Em relação aos neutrófilos, a relação é negativa ao aumento da bacteremia, porque, como acontece hemólise intravascular os restos eritrocitários formam grumos que se depositam ao longo dos vasos que causa reações inflamatórias endotelias (vasculite) e hemorragia focais ocasionando uma migração neutrofílica para esses sítios inflamatórios (Messick et al., 2004; Hoelze et al., 2014).

Hoelze et al. (2007b), Ritzmann et al. (2008) e Stadler et al. (2014) relataram correlação entre diminuição de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos com aumento da bacteremia ou de anticorpos para *M suis*, porém, estes estudos investigavam o comportamento aguda da micoplasmose.

Nos suínos da fase de recria (90 dias) encontrou-se uma correlação entre plaquetas e bacteremia ($y = 582,52 - 16,19x$, $p = 0,04$, $r^2 = 0,286$) diferente do que relatado por Ritzmann et al. (2008) e Stadler et al. (2014). Com base em nosso achado, podemos correlatar com dano vascular e consumo plaquetário.

Fard et al. (2014) elucida que, no momento que acontece a lise eritrocitária no leito vascular acontece uma sedimentação desses restos eritrócitos infectados e assim desencadeiam a formação de complexos imunes que causam danos vasculares que por sua vez ativam processos de coagulação com consumo plaquetário, diátese hemorrágica e resposta inflamatória excessiva (Hoelze et al., 2014).

Nós reconhecemos que os coeficientes determinados por nosso estudo são baixos, no entanto, por tratar-se uma amostragem em condições de infecção natural, mas estudos devem ser realizados com objetivo de aumentar o *n* amostral, bem como, estabelecer um estudo experimental considerando animais portadores *M suis* em fase crônica.

Os parâmetros de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos animais *M suis* positivos da fase de frigoríficos foram significativamente altos em relação as fases de creche, recria e terminação (Figura 1). Essa observação justifica-se porque animais de crescimento possuem um sistema imunológico em desenvolvimento em comparação com animais adultos (180 dias), sendo assim, mas predispostos a infecção pelo micoplasma (Dent et al., 2013).

Nas primeiras fases de vida, os leitões sofrem muito mais pressões de adaptação de manejo em relação animais mais velhos, essas pressões causam estresses fisiológicos que de promovem a susceptibilidade desses indivíduos que podem se infectar, parecer normais por meses até o aparecimento dos sintomas (Hoelze et al., 2008), terem sintomas inespecíficos que podem ser confundidos com outras infecções comum nas primeiras fases criação e até mesmo terem condições levemente anêmica mas nunca serem diagnosticadas por não apresentar sinais clínicos aparentes.

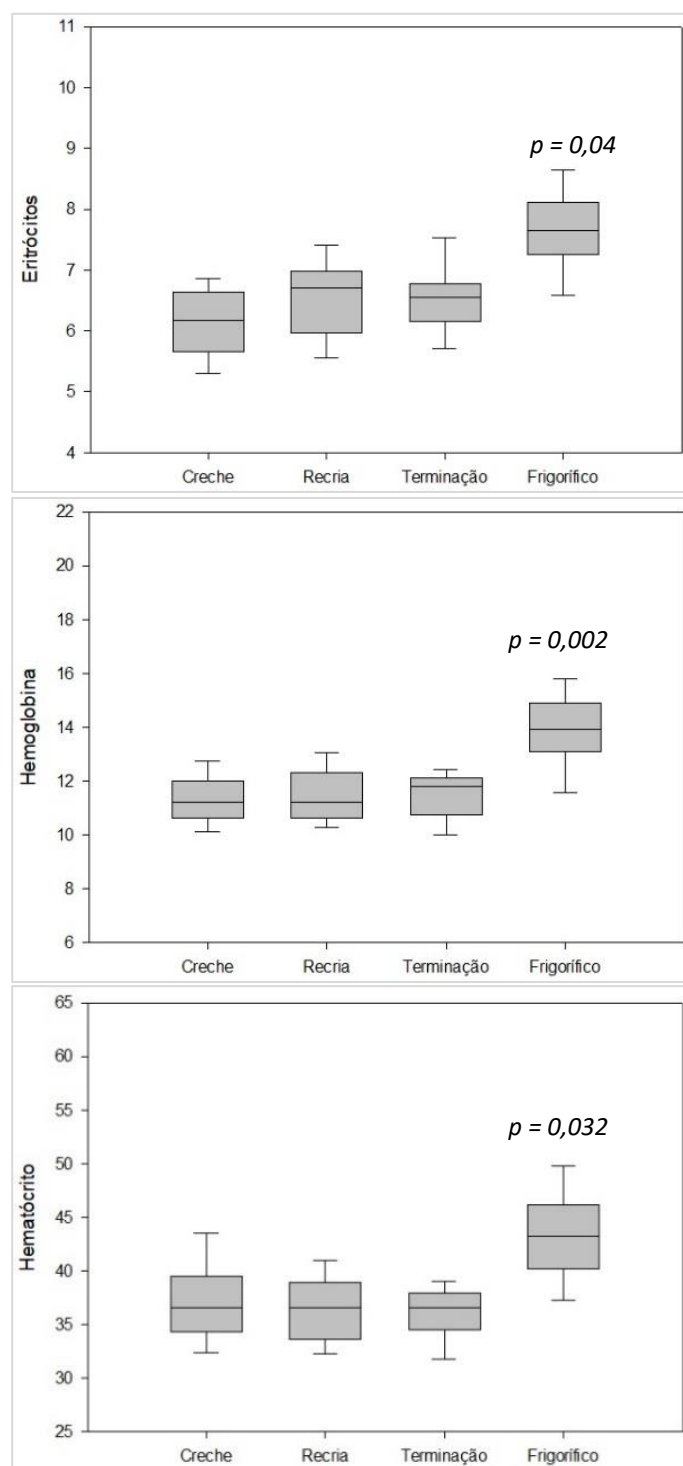


Figura 1. Gráficos de eritócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) de suínos positivos para *Mycoplasma suis* pela metodologia de qPCR divididos pelas fases de criação: creche (45 dias), recria (90 dias), terminação (140 dias) e frigorífico (180 dias). Houve diferença significativa da fase de frigorífico em relação a outras fases nos três parâmetros analisados (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

3.5 CONCLUSÃO

O presente estudo correlacionou os parâmetros hematológicos com a quantificação do número cópias de DNA de *M suis* 16S rRNA em suínos de granjas tecnificadas de ciclo completo em diferentes fases de criação do Estado de São Paulo, Brasil.

Houve correlação em relação a hemoglobina, plaquetas e neutrófilos em com bacteremia de *M suis* que indica a presença de hemólise, dano vascular e consumo plaquetário nos animais portadores de *M suis*.

3.6 REFERÊNCIAS⁵

- Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 4172–4177.
- Busser EV, Mateusen B, Vicca J, Hoelzle LE, Haesebrouck F, Maes D. 2008. *Mycoplasma suis* infection in suckling pigs on a Belgian farm. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. 78: 182-186.
- Bustin AS et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry** 55: 611-622.
- Cannon RM, Roe, RT. 1982. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Bureau of Animal Health: Camberra, 1982. p. 14-17.
- Dent BT, Stevens A, Korvick DL, Clymer JW. 2013. *Mycoplasma suis* infection in pigs after splenectomy. **Laboratory Animal**. 42: 125-128.
- Dias GB, Amaral RB, Gatto IRH, Lapera IM, Oliveira LG, Hoppe EGL, Machado RZ, André MR. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 63: 94-96.
- Dohoo I, Marti W, Stryhn H. Veterinary Epidemiologic Research (2009). VER Inc. 865 p.
- Fard RMN, Vahedi SM, Mohammadkhan F. 2014. Haemotropic mycoplasma (hemoplasmas): a review. **Internacional Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. 2: 1484-1503.
- Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE. 2011. Hemotropic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. **Cells Physiology and Biochemistry**. 27: 557-564.
- Fu Y, Shi T, Xu L, Wei W, Lu F, Zhang X, Yuan X, Li J, LV J, Fang W. 2017. Identification of a novel *Hemoplasma* species from pigs in Zhejiang province, China. **Journal Veterinary Medicine Science** 79: 864-870.

⁵ Normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus Jaboticabal, atualizado em 2018.

- Gatto IRH, Sonálio K, Amaral RB, Morés N, Costa OAD, André MR, Oliveira LG. 2019. **High frequency and molecular characterization of porcine hemotrophic mycoplasmas in Brazil** 231: 33-39.
- Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegle U, Hoelzle LE. 2009. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. **Infection and Immunity**. 77: 576-584.
- Guimarães AMS et al. 2011. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal Applied Microbiology** 111: 417:425.
- Guimarães AMS, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. 2007. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **The Veterinary Record**. 13: 1-4.
- Gwaltney SM. 1995.. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: clinical syndromes and diagnosis. **Swine Health and Production**. 3: 25-27.
- Henderson JP, O'Haga J, Hawe SM, Pratt MCH. 1997. Anaemia and pow viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. **The Veterinary Record**. 8: 144-146.
- Hoelze K, Engels M, Kramer MM, Wittenbrink MM, Dieckmann SM, Hoelzle LE. 2007a. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Veteirnary Microbiology** 143: 405-409.
- Hoelzle K, Grimm J, Ritzmann M, Heinritzi K, Torgerson P, Hamburger A, Wittenbrink MM, Hoelzle LE. 2007b. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. **Clinical and Vaccine Immunology**. 14: 1616-1622.
- Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. 2014. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. **The Veterinary Journal**. 202: 20-25.
- Hoelzle, LE. 2008. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary microbiology**. 130: 215-216.
- Kuramae-Izioka EE. 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Unimar**. 19: 683–689.
- Martin, S. W. et al. 1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**. 14: 33-43.
- Martins MSS et al. 2019. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in extensive pig production systems in the State of Maranhão, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 28: 306-309.
- Messick JB. 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**. 33: 2-13.
- Noordhuizeen JPM et al. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers: The Netherlands, p. 50.
- Prullage JB, Williams, RE, Gaafar, SM. 1993. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology** 50: 125-135.

- Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. 2008. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**. 13: 84-91.
- Santos AP et al. 2008. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. 2008. **Emerging Infectious Diseases**. 14: 1922-1924.
- Song Q et al. 2014. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. **Preventive Veterinary Medicine** 117: 215-221.
- Stadler J, Jannasch C, Mack SL, Dietz S, Zöls S, Ritzmann M, Hoelzle K, Hoelzle LE. 2014. Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. **Veterinary Microbiology**. 172: 294-300.
- Stephan W. 2017. Untersuchung zur intrauterinen Übertragung von *Mycoplasma suis* sowie dem Vorkommen von *Mycoplasma suis* bei Zuchtsauen in Bayern. Dissertation (Tierärztliche Fakultät) – LMU München, Deutschland, 60 p.
- Strait EL, Hawkins PA, Wilson WD. 2012. Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 241: 1666-1667.
- Thorn CE (2012). Normal hematology of the pig. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. **Schalm's: Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, p. 1089-1095.
- Thrusfield M (2007). **Veterinary Epidemiology**. Blackwell Publishing, 2007, 610 p.
- Toledo MA, Leite AI, Gonçalves LR, Sousa KCM, Amaral RB, Silva GCP, Machado RZ, André MR. 2016. High occurrence of *Mycoplasma suis* infection in swine herds from non-technified farms in Mosoró, state of Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 25: 414-417.
- Trhall MA (2012) **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 20-30.
- Yuan CL et al. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal Veterinary Research** 70: 890-894
- Zachary JF, Smith AR. 1985. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. **American Journal Of Veterinary Research**. 46: 821-830.