



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MICKAELLEN SUSANNY DOS SANTOS MARTINS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycoplasma suis* EM SUÍNOS DE CRIAÇÕES
EXTENSIVAS NOS MUNICÍPIOS DE ITAPECURU MIRIM E SANTA RITA
NO ESTADO DO MARANHÃO**

São Luís

2017

MICKAELLEN SUSANNY DOS SANTOS MARTINS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycoplasma suis* EM SUÍNOS DE CRIAÇÕES
EXTENSIVAS NOS MUNICÍPIOS DE ITAPECURU MIRIM E SANTA RITA
NO ESTADO DO MARANHÃO**

Monografia apresentada a Universidade Estadual
do Maranhão como requisito para obtenção do grau
de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Gomes Pereira

São Luís

2017

Martins, Mickaellen Susanny dos Santos.

Detecção molecular de *Mycoplasma suis* em suínos de criações extensivas nos municípios de Itapecuru – Mirim e Santa Rita no estado do Maranhão / Mickaellen Susanny dos Santos Martins. – São Luís, 2017.

46f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. José Gomes Pereira.

1. Hemoplasmose. 2. Suínos. 3. PCR. 4. RtPCR. I. Título.

MICKAELLEN SUSANNY DOS SANTOS MARTINS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Mycoplasma suis* EM SUÍNOS DE CRIAÇÕES
EXTENSIVAS DOS MUNICÍPIOS DE ITAPECURU MIRIM E SANTA RITA
NO ESTADO DO MARANHÃO**

Monografia apresentada a Universidade Estadual do
Maranhão como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. José Gomes Pereira, Dsc – UEMA

(Orientador)

Profa. Maria do Socorro Costa Oliveira Braga, Dsc – UEMA

1º membro

Profa. Carla Janaina Rebouças Marques do Rosário, Msc – UEMA

2º membro

A minha amada bisavó Maria do Socorro Barbosa Lima e meu avô Osiel Ribeiro de
Sousa sinto muito a falta de vocês. *(In memorian)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, dono da minha vida, por me guiar e iluminar durante toda essa jornada de cinco anos de graduação. Meu pai amado, tudo que sou e que tenho é graças ao Senhor.

A minha magnífica mamãe, Sâmela Soraya, por ser minha base, minha força, meu alicerce, meu tudo! Obrigada por me ensinar os valores essenciais para vida e principalmente por ser a melhor mãe do mundo. Te amo mais que tudo!

Ao meu pai, Mário Alves, pelo apoio e ensinamentos!

Aos meus irmãos Carlos Eduardo, Hariadnna Lacerda e Mário Felipe por todo amor e carinho dedicados a mim, sei que poderei contar com vocês sempre. Amo vocês!

Ao meu companheiro de vida, Augusto Mendonça, por toda paciência, carinho, cumplicidade, toda ajuda que sempre tem dedicado a mim, querendo ver o meu melhor sempre e principalmente por todo o seu amor dado, te amo meu amor!

Agradeço às minhas amadas Maria Lúcia (madrinha), Emmanuella Fabbiana (tia), Márcia Regina (Tia), Cícero Flávio (Tio) e Fátima Lima (Avó) por estarem comigo sempre em todos os momentos me dando todo apoio e amor possível.

Agradeço ao meu filho de quatro patas, meu lindo Panda, por ser minha primeira escola prática e por sempre ser o melhor do mundo. Te amo minha criança!

Agradeço ao meu orientador, professor José Gomes Pereira, por todos os ensinamentos, confiança, oportunidade de ser sua bolsista por três anos, sobretudo por me incentivar a perder meus medos e temores de falar em público e até pelos puxões de orelha, com o senhor me tornei uma pessoa muito melhor, o meu muito obrigada por tudo!

Agradeço à toda a equipe formada por trás de todo o projeto, diria em si que foram a força braçal, que colocaram a cara a bater e foram juntos comigo a campo realizar uma parte complicada que são as coletas de sangue dos suínos, tivemos até incidentes que é melhor esquecer! (Hahaha). São eles: Leandro Macedo, Lucas Diniz, Priscila Alencar e Seu Felinto que foi nosso colaborador nas propriedades.

Agradeço imensamente a minha querida banca, que de imediata prontidão se dispuseram a estar aqui comigo hoje e sempre, sendo esta formada pelos professores Maria do Socorro e Ferdinan Melo, vocês contribuíram muito.

Agradeço a todo o corpo docente da UEMA, que de alguma forma pôde contribuir na minha formação profissional e pessoal, em especial aos professores (as) Neide, Lenka, Milena, Expedito, Arnodson, Isabel, Ricardo Teles, Nancylene, Francisco Carneiro, Cleto, Júnior, Evaldo, João, Rudson, Natália, Lucílio, Helder, Ana Lúcia, Rêgo.

Às minhas amigas irmãs Emanuela Sousa, Even Kaline, Bruna Souza e Jéssica Lopes companheiras de todos os dias. Com vocês me tornei uma pessoa melhor, aprendi o sentido de uma amizade com pessoas tão diferentes, cada uma com sua particularidade encantadora. Amo vocês minhas meninas e levarei para sempre no meu coração.

Agradeço a toda a equipe da UNESP que me recebeu e me deu a oportunidade de desenvolver esse projeto na sua área física na unidade de Jaboticabal, tive como ver de perto como muitos processos funcionam e ter acesso a informações e conhecimentos novos que me enriqueceram bastante, em especial a professora Rosângela Zacarias, professor Marcos André, mestrando Renan, graduandos Guilherme Bim e Bruna Massucatto.

Às amigas que fiz durante a graduação, Taynan Dulce, Gleicyanne, Ingrid, Liziane, muito obrigada por todo apoio e por sempre estarem de prontidão para me estender um ombro amigo, por me ajudar em tudo, até nas trocas de problemas.

À Italla Araújo, por me ensinar como eram feitos os procedimentos feitos no laboratório de patologia molecular com toda paciência e carinho.

Agradeço à Mariana Toledo, que mesmo sem me conhecer, agarrou minha causa para ela e não mediu esforços para me ajudar, foi de suma importância!

A todos meus familiares e amigos que contribuírem de forma direta ou indireta na minha formação. A vocês o meu muito obrigado!

Ao CNPq pela concessão da bolsa e a UEMA por toda estrutura para realização do projeto, irei sentir muita falta.

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.*

*Há tempo de nascer, e tempo de morrer;
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;*

*Tempo de matar, e tempo de curar;
tempo de derrubar, e tempo de edificar;*

*Tempo de chorar, e tempo de rir;
tempo de prantear, e tempo de dançar;*

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;
tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;*

*Tempo de buscar, e tempo de perder;
tempo de guardar, e tempo de lançar fora;*

*Tempo de rasgar, e tempo de coser;
tempo de estar calado, e tempo de falar;*

*Tempo de amar, e tempo de odiar;
tempo de guerra, e tempo de paz. ”*

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO

Mycoplasma suis é uma bactéria patogênica que se adere e invade a superfície dos eritrócitos de suínos, gerando deformações estruturais nas células parasitadas. No Brasil, poucos são os relatos na literatura acerca do parasito, da doença e de seus impactos econômicos nas esferas produtiva e sanitária. O parasito em questão enquadra-se no grupo dos micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas), na Ordem Mollicutes, e é incriminado como agente etiológico da hemoplasmosse suína. A presente pesquisa teve por objetivo realizar, por meio da PCR em Tempo Real Quantitativa, a detecção molecular de *Mycoplasma suis* em amostras de sangue de 65 suínos de criações extensivas dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita no Estado do Maranhão. Após a extração de DNA das amostras de sangue utilizando o kit comercial, procedeu-se à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para o gene endógeno GAPDH, a fim de descartar resultados falso-negativos em função da presença de inibidores. As amostras positivas na reação supracitada foram submetidas a ensaios de qPCR para *Mycoplasma suis* com base no gene 16S rRNA. Todas as reações foram realizadas respeitando as normas estabelecidas pelo MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments). Das 65 amostras, em Itapecuru Mirim tivemos 17 (56,6%) que se mostraram positivas para o gene endógeno GAPDH. Das 17 amostras, 14 (82,35%) mostraram-se positivas para na qPCR para *Mycoplasma suis*, já em Santa Rita tivemos 23 (65,7%) que se mostraram positivas para o gene endógeno GAPDH. Sendo 15 (65,21%) positivas para qPCR para *Mycoplasma suis*. A quantificação absoluta variou de $6,07 \times 10^2$ cópias a $1,77 \times 10^6$ de um fragmento do gene 16S rRNA/ μ L, com média de $2,29 \times 10^5$ cópias/ μ L entre os animais positivos em Itapecuru Mirim e Santa Rita a quantificação absoluta variou de $7,05 \times 10^4$ cópias a $1,44 \times 10^2$ de um fragmento do gene 16S rRNA/ μ L com média de $1,16 \times 10^4$. Este estudo, embora ainda com resultados inéditos, mostra que *Mycoplasma suis* circula entre suínos de criações extensivas dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita, Estado do Maranhão. O potencial patogênico dos isolados necessitam de maiores investigações, a fim de se estimar o prejuízo da hemoplasmosse no cenário da suinocultura no Estado do Maranhão. O possível papel desses animais como fonte de infecção de *Mycoplasma suis* para outros animais, assim como seu potencial patogênico dos isolados necessitam de maiores investigações.

Palavras-chave: Suínos, *Mycoplasma suis*, Hemoplasmosse.

ABSTRACT

Mycoplasma suis is a pathogenic bacterium that sticks and invades on the surface of swine erythrocytes, generating structural deformations in the parasitized cells. In Brazil, there are few reports on books about the parasite, disease or its economic impacts in the productive and sanitary spheres. The parasite in question fits into the group of hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas) in the order Mollicutes, and is responsible for the etiological agent of swine hemoplasmosis. The aim of the present research was to quantify, having as background the Real Time Quantitative PCR, the molecular detection of *Mycoplasma suis* in blood samples from 65 pigs from extensive farms in the cities of Itapecuru Mirim and Santa Rita, Maranhão, Brazil. After DNA extraction from the blood samples using the commercial kit, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed for the endogenous GAPDH gene in order to rule out false-negative results due to the presence of inhibitors. The positive samples in the aforementioned reaction were submitted to qPCR assays for *Mycoplasma suis* based on the 16S rRNA gene. All reactions were performed in compliance with the standards established by the MIQE (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments). Of the 65 samples, in Itapecuru Mirim we had 17 (56.6%) that were positive for the endogenous GAPDH gene. As of the 17 samples, 14 (82.35%) were positive for qPCR for *Mycoplasma suis*, whereas in Santa Rita we had 23 (65.7%) that were positive for the endogenous GAPDH gene. Being 15 (65.21%) positive for qPCR for *Mycoplasma suis*. Absolute quantification ranged from 6.07×10^2 copies to 1.77×10^6 of a fragment of the 16S rRNA / μL gene, with a mean of 2.29×10^5 copies / μL between the positive animals in Itapecuru Mirim and Santa Rita. Absolute quantification ranged from 7.05×10^4 copies to 1.44×10^2 of a fragment of the 16S rRNA / $\lambda 1$ gene, with a mean of 1.16×10^4 copies / μL among positive animals. This study, although still with unpublished results, shows that *Mycoplasma suis* circulates among swine from extensive farms in the cities of Itapecuru Mirim and Santa Rita, in the State of Maranhão. The pathogenic potential of the isolates needs further investigation in order to estimate the hemoplasmosis damage in the swine industry in the State of Maranhão. The possible role of these animals as a source of *Mycoplasma suis* infection for other animals, as well as their pathogenic potential of the isolates, need further investigation.

Keywords: Swine, *Mycoplasma suis*, hemoplasmosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura (A e B) e de transmissão (C e D) de hemácias infectadas pelo <i>Mycoplasma suis</i> . As diferentes formas morfológicas e características de <i>Mycoplasma suis</i> são mostradas invadindo as hemácias.	21
Figura 2 – Mapa territorial do município de Itapecuru Mirim, no Estado do Maranhão.	25
Figura 3 – Mapa territorial do município de Santa Rita, no Estado do Maranhão.	25
Figura 4 – Resultado da amplificação por qPCR de <i>Mycoplasma suis</i> em gel de agarose para as amostras do município de Itapecuru Mirim.	30
Figura 5 - Resultado da amplificação por qPCR de <i>Mycoplasma suis</i> em gel de agarose para as amostras do município de Santa Rita.	31
Figura 6 - Resultado da amplificação por qPCR de <i>Mycoplasma suis</i> em gel de agarose para as amostras do município de Santa Rita.	31
Figura 7 - Curva de amplificação das amostras do município de Itapecuru Mirim.	34
Figura 8 - Curva padrão da reação para qPCR para <i>M. Suis</i> baseada no gene 16S rRNA das amostras do município de Itapecuru Mirim, Maranhão.	34

Figura 9- Curva de amplificação das amostras do município de Santa Rita	35
Figura 10 – Curva padrão da reação para qPCR para <i>Mycoplasma suis</i> baseada no gene 16S rRNA das amostras do município de Santa Rita.	35
Quadro 1 - Médias dos Cqs, números de cópias/ μL , e parâmetros da reação (eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto) para cada amostra de DNA extraída de sangue de suínos no município de Itapecuru Mirim, Maranhão.	32
Quadro 2. Médias dos Cqs, números de cópias/ μL , e parâmetros da reação (eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto) para cada amostra de DNA extraída de sangue de suínos no município de Santa Rita, Maranhão.	33

LISTA DE SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etinodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunosorbente ligado à enzima

GAPDH - Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

M.SUIS – *Mycoplasma suis*

ml – Mililitro

mm – Milímetro

Nº - Número

PCR - Reação em cadeia de polimerase

qPCR – PCR quantitativa

RNA - Ácido ribonucleico

Rrna – Ácido ribonucleico ribossomal

X – Vezes

% - Porcentagem

°C – Graus célsius

µL - Microlitro

UEMA - Universidade Estadual do Maranhão

UNESP – Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 <i>Mycoplasma suis</i>	18
2.2 Sinais clínicos e lesões	19
2.3 Epidemiologia	20
2.4 Patogenia.....	20
2.5 Diagnóstico.....	21
2.6 Controle.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Local de Estudo	26
4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos agentes patogênicos que podem causar prejuízos econômicos e afetar o bem-estar animal é de extrema importância para a pecuária em geral. Tratando-se da suinocultura, o Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína e, portanto, submetido a grandes pressões a fim de se manterem altos na esfera sanitária e produtiva (GUIMARÃES et al., 2007).

Um dos agentes patogênicos que afeta os suínos e acarreta prejuízos econômicos é o *Mycoplasma suis* (GUIMARÃES et al., 2011). Micoplasmas hemotróficos, ou hemoplasmas, são bactérias não cultiváveis, epicelulares, com parede celular ausente, sensíveis a tetraciclina e que se adere e invade à superfície dos eritrócitos causando deformações estruturais de uma variedade de mamíferos (HOELZLE, 2008). O parasito apresenta pleoformismo, pequenas dimensões (380 a 600nm de diâmetro), podendo ser encontrado na forma de cocos, anéis ou bastonetes aderidos à superfície das hemácias ou livres no plasma sanguíneo (NEIMARK et al., 2001; ZACHARY E BASGALL, 1985).

Segundo a classificação molecular atual, esses parasitos estão localizados na ordem Mollicutes, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (HOLZLE, 2008).

A hemoplasmosse dos suínos, causada pelo *Mycoplasma suis* (MESSICK, 2004), possui distribuição geográfica mundial, atingindo animais de várias idades. Suínos infectados apresentam anemia hemolítica severa ou crônica moderada, infertilidade e imunossupressão, levando à perdas econômicas (HOELZLE, 2008).

Pode ser transmitido experimentalmente por inoculação subcutânea, intravenosa, intraperitoneal e oral. O parasito é frequentemente transmitido mecanicamente, por meio de seringas e instrumentos cirúrgicos contaminados (HENRY, 1979). Leitões recém-nascidos podem ser infectados congenitamente pela placenta (ENDERSON et al., 1997). Sob condições naturais, o período de incubação parece variar muito e é dependente da susceptibilidade, da extensão da infecção e do estresse fisiológico de cada animal em si. Animais infectados podem demonstrar-se como assintomáticos por meses até o aparecimento dos sinais clínicos, e é provável que muitos desses nunca apresentem qualquer sintomatologia clínica (HOELZLE, 2008).

Do ponto de vista epidemiológico, a hemoplasmose suína é frequentemente encontrada na sua forma subclínica, com grande parcela dos animais infectados mostrando-se como portadores crônicos. Tal fato deve-se, provavelmente, ao amplo uso de aditivos contendo antibióticos na dieta suína (MESSICK, 2004).

O diagnóstico da hemoplasmose em suínos tem sido baseado em observação microscópica dos organismos na superfície de eritrócitos em esfregaços de sangue corados, mas este método é limitado em casos de infecção aguda, porque os parasitas não são sempre aparentes, a menos que a parasitemia esteja em alta e desenvolvida, mostrando-se de baixa sensibilidade e especificidade. A sorologia, embora menos frequentemente utilizada no diagnóstico, pois existe uma certa dificuldade em obter antígenos específicos, também pode ser utilizada, por meio das técnicas de Fixação de Complemento (BALJER et al., 1989; SCHULLER et al., 1990; SPLITTER, 1958), Hemaglutinação Indireta (SMITH, A.R.; RAHN, T. 1975) e o Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (ELISA) (HSU et al., 1992; SCHULLER et al., 1990).

Técnicas moleculares, como a PCR, são métodos mais efetivos para a identificação de micoplasmas hemotróficos, mostrando-se altamente sensíveis e específicas para o diagnóstico do *Mycoplasma suis* (HOELZLE, 2008). A PCR em Tempo Real traz ainda como vantagens o baixo risco de contaminação, o alto rendimento e padronização, especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e confiabilidade.

A imunossupressão associada à hemoplasmose suína leva a um aumento da susceptibilidade dos animais parasitados à infecção por outros patógenos envolvidos em síndromes respiratórias e entéricas (ZACHARY, J.F.; SMITH, A.R. 1985). A antibioticoterapia, embora contribua para a melhoria do quadro clínico, mostra-se incapaz de eliminar o parasito (GRESHAM et al., 1994). Por isso, suínos persistentemente parasitados e com infecção clínica assintomática permanecem como portadores do *Mycoplasma suis* dentro de seus rebanhos ou entre diferentes rebanhos. A prevalência do parasita na indústria suína é atualmente desconhecida. Na grande maioria das vezes, a hemoplasmose suína é subdiagnosticada, devido à baixa sensibilidade e especificidade dos métodos diretos de exame de esfregaços sanguíneos corados, rotineiramente empregados. Ademais, tal fato deve-se também à infrequente colheita e

remessa de amostras sanguíneas dos suínos para exames laboratoriais na suinocultura (STRAIT, E.L.; HAWKIN, P.A.; WILSON, W.D., 2012).

O potencial zoonótico do *Mycoplasma suis* ainda necessita de maiores investigações. Neste aspecto, o agente sob estudo foi detectado, por meio de métodos moleculares, em veterinários e trabalhadores de uma suinocultura em Shangai, China (YUAN et al., 2009).

Desta forma, o presente trabalho justifica-se pela importância do diagnóstico preciso do parasito por meio de métodos moleculares mais sensíveis e específicos, fornecendo dados a respeito da ocorrência de *Mycoplasma suis* em sistemas de criação extensivos de suínos no Estado do Maranhão que pertence à região Nordeste do Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Mycoplasma suis*

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

Os micoplasmas são procariontes pertencentes à Divisão Tenericutes e à Classe dos Mollicutes (do latim, molli, suave; cutes, cútis ou derme), nome de cuja origem se deve à característica peculiar da total ausência de parede e da molécula de peptideoglicano, sendo o seu citoplasma envolvido somente por uma membrana trilaminar. Os micoplasmas são considerados os menores microrganismos de vida livre capazes de auto-replicação, com dimensões médias variando de 0,2 a 0,4 µm de diâmetro. Em função destas dimensões, estes organismos passam através de poros de membranas filtrantes com diâmetros de até 0,45 µm. A ausência da parede celular determina características consideradas peculiares, tais como um acentuado pleomorfismo. O seu formato pode variar de esférico, bacilar, filamentoso e helicoidal, como por exemplo os espiroplasmas que podem atingir 100 µm de comprimento (WHITHEAR; BROWNING, 2004).

Micoplasmas hemotrópicos costumam ser espécie específicos, porém há registros de humanos infectados pelos mesmos (YANG, 2000; SANTOS et al., 2008; YUAN et al., 2009). As hemoplasmoses dos animais são variáveis sob o ponto de vista de severidade e podem ocorrer desde infecções crônicas sem sinais clínicos até quadros com anemia hemolítica aguda com presença de anorexia, febre, icterícia e hipoglicemia de acordo com as espécies envolvidas (BIONDO, 2009). A utilização de antimicrobianos como aditivos na alimentação dos suínos podem levar a ocorrência de casos crônicos ou subclínicos, em que os sinais clínicos não são característicos (HOELZLE, 2008).

2.2 Sinais clínicos e lesões

As primeiras descrições dos sinais clínicos e lesões da hemoplasmoose suína foram feitas por Kinsley (1932) e a caracterizavam como uma icterioanemia com sinais de icterícia, sangue fluidificado, hemorragia nos pulmões, coração e rins, esplenomegalia e fígado aumentado com coloração amarelada ou descorado.

A doença aguda é caracterizada por anemia hemolítica que pode ser letal e ocorre preferencialmente em suínos em terminação ou ainda em leitões lactantes, em crescimento e em porcas (ZACHARY, 1985). Em leitões lactantes observa-se palidez e icterícia com desidratação, ganho de peso inadequado e predisposição a ocorrência de outras infecções. Já em leitões de creche e crescimento além destes sinais, se observa febre que pode ultrapassar os 42°C (HEINRITZI, 1990). Os leitões acometidos na forma aguda tendem a se tornar hipoglicêmicos e entrarem em coma seguido de óbito (MESSICK, 2004).

Uma variedade de sinais clínicos pode estar presente e ser observado, como: dispneia, enterite, fezes com coloração biliar, cianose e necrose de borda de orelhas (HEINRITZI, 1990).

Em porcas comumente ocorre febre alta e anorexia imediatamente ou de um a três dias após transferência para a maternidade levando, normalmente, a menor produção de leite e comportamento materno alterado (THACKER, 2006). O mesmo autor relata que a infecção crônica em porcas pode levar ao anestro, atraso no cio, morte embrionária precoce e abortamento e lesões de pele como hipersensibilidade com formação de urticárias. Brownback (1981) descreveu as características dos efeitos reprodutivos causados pela hemoplasmoose suína.

A susceptibilidade individual, relacionada à resposta imune, pode ainda interferir nos aspectos clínicos (MESSICK, 2004). As síndromes relacionadas à hemoplasmoses suína crônica podem estar envolvidas com maiores perdas econômicas (HOELZLE, 2008).

2.3 Epidemiologia

A hemoplasmoses suína tem ocorrência relatada em vários países produtores de suínos como no Brasil, EUA, Alemanha, China, África do Sul, Hungria, República Tcheca, entre outros (SMOLA et al., 2008). A taxa de prevalência real é de difícil obtenção devido à dificuldade de diagnóstico desta bactéria incultivável (HOELZLE, 2009). No Brasil alguns estudos, na tentativa do diagnóstico, obtiveram resultados conflitantes devido, possivelmente, ao método diagnóstico.

Sobestiansky et al. (1990; 1999) relatam a ocorrência no Brasil somente com diagnóstico clínico e não encontraram resultados conclusivos em esfregaços sanguíneos como diagnóstico diferencial de doenças respiratórias.

Kuchiishi et al. (2001) também não encontraram resultados positivos em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa em 1400 amostras de sangue de animais abatidos colhidos em 14 semanas num frigorífico do estado de Santa Catarina. Guimarães et al. (2007) estudaram a ocorrência em quatro rebanhos comerciais na região Sul e a prevalência média foi de 33,1 % com a técnica de PCR em tempo real confirmada com Southern Blot.

Estudos na China já demonstraram a infecção pelo *M. suis* em humanos (YUAN, 2009). A transmissão experimental da hemoplasmoses suína foi confirmada pelas vias intravenosa, inoculação oral, subcutânea e intraperitoneal enquanto que a infecção natural foi demonstrada pela utilização de material contaminado como instrumentos cirúrgicos e agulhas (HENRY, 1979). Os ectoparasitas, como o piolho *Haematopinus suis*, têm sido atribuídos à transmissão por picadas (Messick, 2004). Também, segundo Matos et al. (2007) se atribui a transmissão a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e ao ácaro da sarna suína (*Sarcoptes scabiei* var. *suis*).

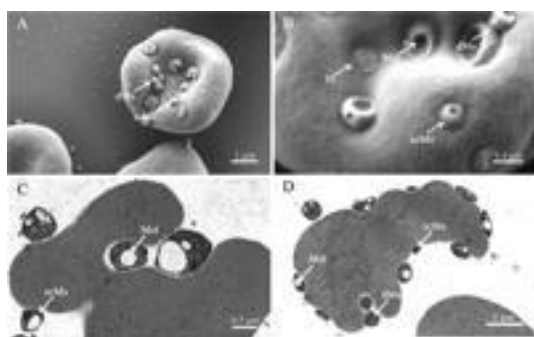
2.4 Patogenia

A principal ação do *M. suis* é causar icteroanemia aguda em suínos onde se observa altas contagens do mesmo no sangue confirmado por exames de PCR

(HOELZLE, 2008). Historicamente, o mecanismo da patogenicidade do *M. suis* seria a característica ligação dos agentes hemoparasitas com a superfície da hemácia do hospedeiro onde a bactéria causaria alteração e consequente lise da mesma (ZACHARY et al., 1985).

Groebe et al. (2009) observaram que baixa contagem de MS (*Mycoplasma suis*) era notada entre hemácias ou em sua superfície, enquanto que altas contagens eram evidenciadas no PCR quantitativo. Assim comprovou-se que existe a invasão do micoplasma no interior da hemácia (Figura 1).

A invasão das hemácias possibilita a evasão do sistema imune, redução da eficácia dos antibióticos além dos benefícios nutricionais (GROEBEL et al., 2009). Estas possibilidades de invasão de hemácias podem explicar a tendência à cronicidade dos micoplasmas hemotrópicos (MESSICK, 2004). A cronicidade por sua vez pode resultar em ocorrências de desordens reprodutivas, ineficiência na conversão alimentar, e aumento na susceptibilidade à infecções secundárias como as respiratórias e entéricas. Por sua vez é esta a forma de maior importância econômica (HOELZLE, 2007).



Microscopia eletrônica de varredura (A e B) e de transmissão (C e D) de hemácias infectadas por *M. suis*. As diferentes formas morfológicas e características de *M. suis* são mostrados invadindo as hemácias.

Figura 1 – Demonstração do *M. suis* invadindo as hemácias

Fonte: (GROEBEL et al., 2009).

2.5 Diagnóstico

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

Atualmente não se dispõem de um método que possibilite ensaios de rotina embora a literatura cite a Fixação de Complemento e ELISA (SCHULLER et al., 1990; ZHANG et al., 2008) ou a Hemaglutinação Indireta (SMITH; RAHN, 1975).

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

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

2.6 Controle

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

A principal dificuldade no desenvolvimento de uma vacina efetiva é a impossibilidade do cultivo in vitro do agente sendo que vacinas derivadas de animais infectados foram testadas, porém estas podem conter componentes sanguíneos com possibilidades de reações imunes ou ainda da impossibilidade de atenuação por passagens em meios como naquelas vacinas oriundas de microrganismos cultiváveis. Também, os fatores de virulência ainda não estão estabelecidos, sendo que a ligação do

micoplasma com a hemácia parece ser uma via crucial no desenvolvimento de uma vacina (HOELZLE et al., 2009).

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

2. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Verificar a ocorrência de *Mycoplasma suis* em suínos de criações extensivas do Estado do Maranhão, por meio da PCR em Tempo Real Quantitativo.

3.2 Específicos

- Avaliar a carga parasitária de *Mycoplasma suis* em suínos de criações extensivas dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita no Estado do Maranhão.
- Detectar a presença de *Mycoplasma suis* em suínos de criações extensivas dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita no Estado do Maranhão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo



Figura2:<https://pt.wikipedia.org/wiki/Itapecuru-Mirim>



Figura3:
<http://kamaleao.com/saoluis/7507/santa-rita-maranhao>

O estudo foi realizado nos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita, Estado do Maranhão, o primeiro fica situado na microrregião de Itapecuru Mirim, tendo em 2016, uma população estimada pelo IBGE em 67.104 habitantes, sendo a cidade mais importante da sua microrregião e a 18ª maior cidade do estado. Já Santa Rita, localiza-se na microrregião de Rosário, tem uma população de 35.364 habitantes, segundo estimativa do IBGE em 2014. Possui área de 706,38 km².

A coleta das amostras sanguíneas realizou-se em propriedades de criadores extensivos de suínos, de forma casuística, de acordo com o número de animais disponíveis. Esses pequenos produtores de suínos dos municípios têm suas criações classificadas como de subsistência, sem tecnificação e envolvendo mão-de-obra familiar.

A pesquisa é decorrente de um projeto de pesquisa sendo este aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Protocolo Nº 004/2015 CEEA/UEMA).

4.2 Colheita das Amostras

Foram realizadas coletas de sangue por venopunção, utilizando tubo tipo vacutainer com anticoagulante, para a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em 65 suínos de criações extensivas sendo 30 no município de Itapecuru Mirim e 35 no município de Santa Rita, Estado do Maranhão. As amostras de sangue foram armazenadas em microtubos de 1,5 ml estéreis, esse material coletado foi transportado em caixas isotérmicas com gelo reciclável e posteriormente acondicionado em freezer a - 20°C no Laboratório de Imunodiagnóstico, da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no curso de Medicina Veterinária, Campus São Luís - MA.

O estudo realizado foi uma parceria entre a Universidade Estadual do Maranhão e a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita (UNESP), campus de Jaboticabal, São Paulo. O processamento laboratorial para realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal.

4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

É uma reação que permite a amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) in vitro.

4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA de sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante, no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP Jaboticabal. Logo após, o DNA extraído foi identificado e armazenado a - 20°C para realização da PCR.

4.3.2 PCR Convencional para gene endógeno GAPDH

Foi realizado um controle endógeno da PCR com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR convencional objetivando a amplificação do gene GAPDH (Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase) de mamíferos (controle endógeno da reação). A PCR foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 5'-

GTGATGCTGGTGCTGAGTATG -3' e 5'- GTGATGGCATGGAC (G/T) GTGG- 3', que flanqueiam uma região de 282 pb do gene supracitado (CHAMIZO et al., 2001).

A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq DNA Polimerase (GeneDireX®, Biochem Life Science, Índia), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as amostras que tiveram expressão adequada de GAPDH foram consideradas como tendo amplificação adequada do DNA. Para verificar a ausência de inibidores nas amostras de DNA, foi realizada uma reação de PCR para o gene endógeno GAPDH, seguindo o protocolo estabelecido por Birkenheuer et al. (2003). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µL/ml) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados utilizando-se um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemi Doc Imaging System, BioRad®).

4.3.3 PCR em tempo real específica para *Mycoplasma suis* baseada no gene 16S rRNA

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), usando o sistema de detecção TaqMan®, utilizou primers e sonda segundo descrito por Guimarães et al. (2011). Os primers foram criados para amplificar um fragmento do gene 16S Rrna.

As amostras de DNA extraídas que foram submetidas a uma PCR convencional para o gene endógeno GAPDH e que foram aptas vieram a ser submetidas a uma PCR em tempo real baseada no gene 16S rRNA para *Mycoplasma suis*, utilizando-se os

oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) Forward (5'-CCCTGATTGTACTAATTGAATAAG-3') e Reverse (5'-GCGAACAACCTTGTTAAGCAAG-3') e a sonda de hidrólise TaqMan (5'-FAM-TGRATACACAYTTCAG-MGBNFQ3') (GUIMARÃES et al., 2011). A reação de amplificação foi realizada 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 foi de: 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. Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões 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). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula $(Xg/ \mu L \text{ DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} \times \text{cópias do plasmídeo}/\mu L$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo foram realizados a PCR convencional para a detecção do gene GAPDH e PCR em tempo real quantitativa específica para *Mycoplasma suis* baseada no gene 16S rRNA. Dessa forma, obtivemos 40 amostras positivas para o gene GAPDH, em que essas foram consideradas aptas a realização da PCR em tempo real, sendo 17 do município de Itapecuru Mirim e 23 no município de Santa Rita, já que o gene GAPDH nos afirma que o DNA encontrado está em qualidade adequada, tendo o mesmo amplificado. Onde 29 amostras se mostraram positivas para o *Mycoplasma suis*.

A PCR em tempo real representa o último avanço na tecnologia da PCR. Todos os testes diagnósticos que envolvem um método molecular de amplificação, como a PCR, compreendem as etapas de extração de ácidos nucleicos de amostras biológicas, seguido de amplificação de um segmento selecionado mediante a reação em cadeia pela polimerase e de detecção dos fragmentos amplificados durante o processo. A PCR em tempo real associa a metodologia de PCR a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de quantificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. A possibilidade de monitorar, ao longo da reação, a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante a sua fase ótima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional.

Das 30 amostras de Itapecuru Mirim, 17 (56,6%) mostraram-se positivas para o gene endógeno GAPDH como pode ser observado na Figura 4 que mostra o resultado da amplificação em gel de agarose, indicando que o DNA estava íntegro e que não havia inibidores da reação nessas amostras. Das 17 amostras, 14 (82,35) mostraram-se positivas para na qPCR para *M. suis* podendo ser visto no Quadro 1 que nos traz as médias dos ciclos de quantificação, o número de cópias/ul e parâmetros da reação como a eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto para cada uma das amostras de DNA extraída de sangue dos suínos do município de Itapecuru Mirim e ainda nas Figuras 7 e 8 temos a curva de amplificação das amostras e a curva padrão da reação na

Qpcr para *M.suis* baseada no gene 16s Rrna das amostras do município de Itapecuru Mirim sendo estas fornecidas pela máquina usada.

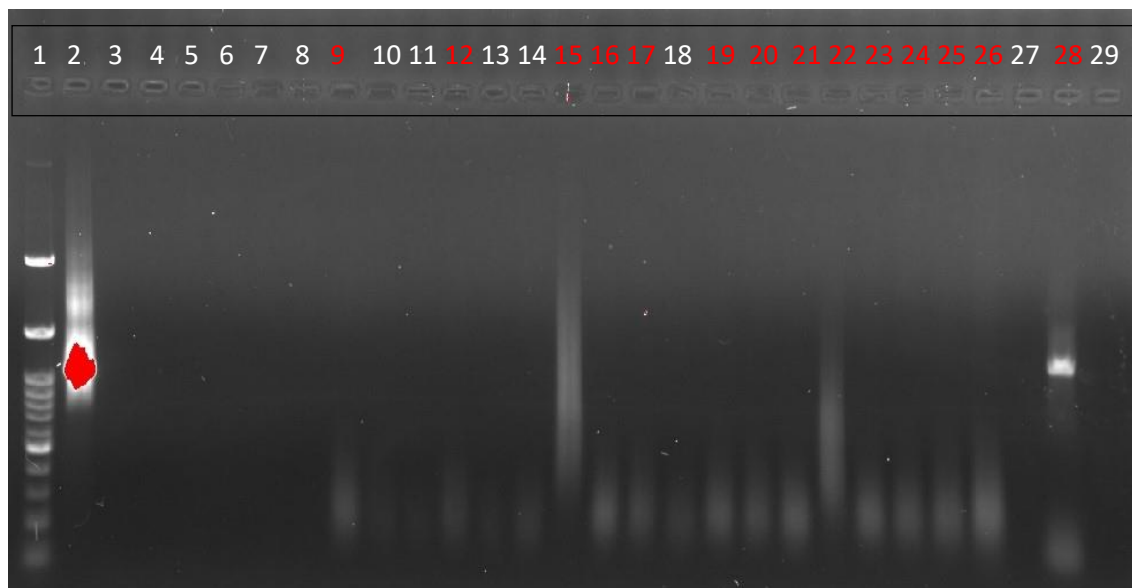


Figura 4 - Resultado da amplificação por qPCR de *Mycoplasma suis* em gel de agarose. Canal 1: marcador de peso molecular/Ladder; Canal 2: Controle positivo; Canal 9,12,15,16,17,19,20,21,22,23,24,25,26, e 28: Amostras positivas; Canal 29: Controle negativo

Das 35 amostras de Santa Rita, 23 (65,7%) mostraram-se positivas para o gene endógeno GAPDH como pode ser observado na Figura 5 e 6 mostrando o resultado da amplificação em gel de agarose, indicando que o DNA estava íntegro e que não havia inibidores da reação nessas amostras. Das 23 amostras, 15 (65,21%) mostraram-se positivas para na qPCR para *M. suis* podendo ser visto no Quadro 2 que nos traz as médias dos ciclos de quantificação, o número de cópias/ul e parâmetros da reação como a eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto para cada uma das amostras de DNA extraída de sangue dos suínos do município de Santa Rita e ainda nas Figuras 9 e 10 temos a curva de amplificação das amostras e a curva padrão da reação na Qpcr para *M.suis* baseada no gene 16s Rrna das amostras do município de Santa Rita sendo estas fornecidas pela máquina usada.

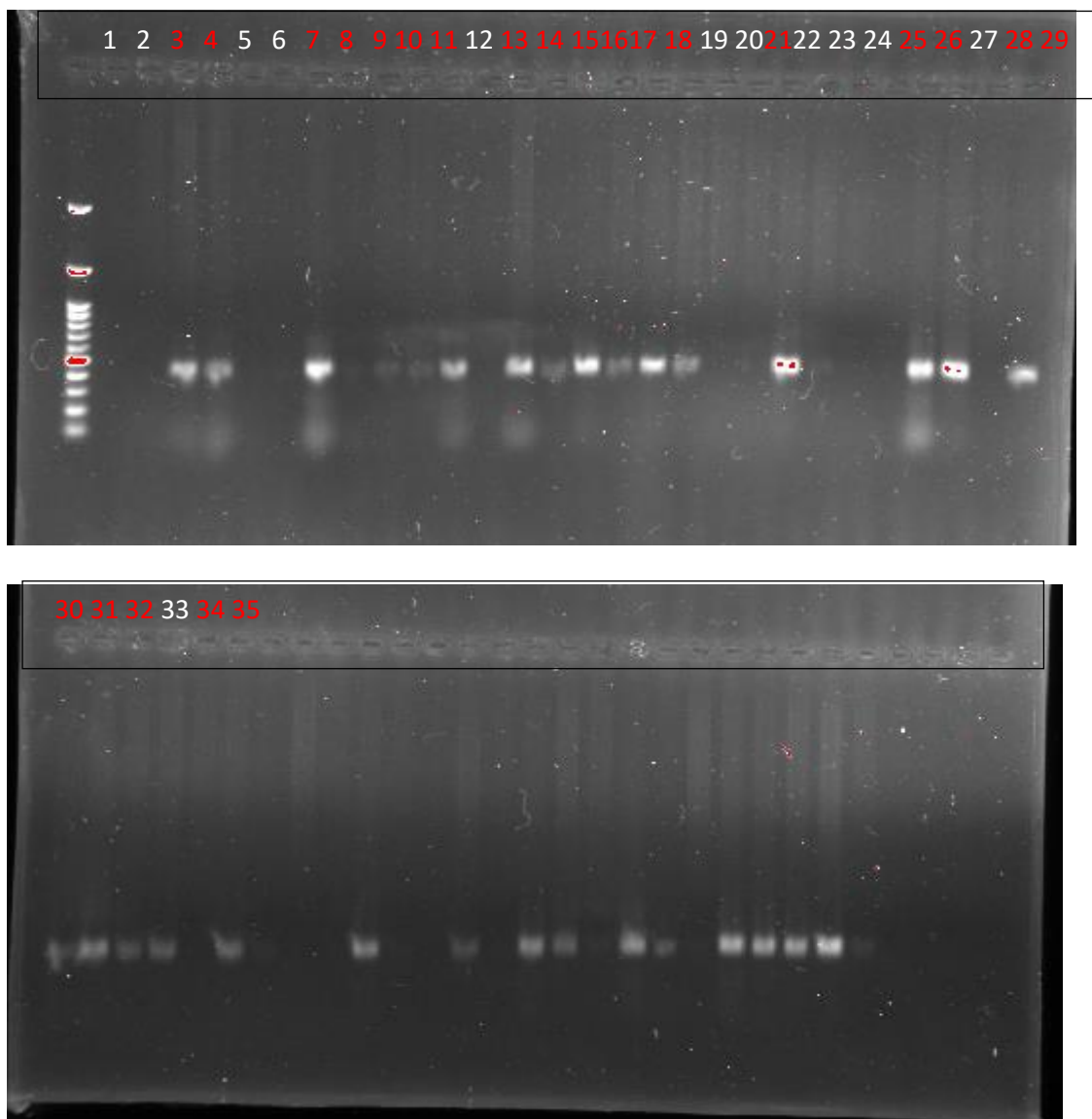


Figura 5 e 6- Resultado da amplificação por qPCR de *Mycoplasma suis* em gel de agarose. Canal 1: marcador de peso molecular/Ladder; Canal 2: Controle positivo; Canal 3,4,7,8,9,10,11,13,14,15,16,17,18,21,25,26,28,29,30,31,32,34 e 35: Amostras positivas;

Quadro 1. Médias dos Cqs, números de cópias/ μL , e parâmetros da reação (eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto) para cada amostra de DNA extraída de sangue de suínos no município de Itapecuru Mirim, MA.

Amostra	Média Cqs	Média de Quantificação	Eficiência	R^2	Slope	Y- intercepto
		(cópias/ μL)				
09	25,59	$5,89 \times 10^4$	94,9%	0,977	-3,450	42,050
12	22,59	$4,36 \times 10^5$				
15	27,15	$2,07 \times 10^4$				
16	20,50	$1,77 \times 10^6$				
17	24,29	$1,43 \times 10^5$				
19	26,39	$3,48 \times 10^4$				
20	26,50	$3,23 \times 10^4$				
21	25,83	$5,22 \times 10^4$				
22	32,54	$6,07 \times 10^2$				
23	26,77	$2,67 \times 10^4$				
24	28,52	$8,31 \times 10^3$				
25	26,34	$3,72 \times 10^4$				
27	22,17	$5,78 \times 10^5$				
28	28,86	$6,65 \times 10^3$				

Quadro 2. Médias dos Cqs, números de cópias/ μL , e parâmetros da reação (eficiência, coeficiente de correção, R^2 e y-intercepto) para cada amostra de DNA extraída de sangue de suínos no município de Santa Rita, MA.

Amostra	Média Cqs	Média de Quantificação	Eficiência	R^2	Slope	Y- intercepto
		(cópias/ μL)				
03	26,08	$1,66 \times 10^4$	91,1%	0,992	-3,555	42,016
04	28,32	$7,15 \times 10^3$				
07	27,95	$9,05 \times 10^3$				
08	25,82	$1,71 \times 10^4$				
09	27,44	$1,27 \times 10^4$				
10	31,20	$1,11 \times 10^3$				
11	33,10	$3,22 \times 10^2$				
13	26,28	$2,67 \times 10^4$				
16	28,65	$5,74 \times 10^3$				
21	30,50	$8,36 \times 10^2$				
25	29,13	$4,21 \times 10^3$				
26	34,35	$1,44 \times 10^2$				
28	24,79	$7,05 \times 10^4$				
29	31,36	$1,01 \times 10^3$				
34	33,02	$3,41 \times 10^2$				

A eficiência da qPCR foi de 94,9%, r^2 de 0,977, y int. 42,050 e slope de -3,450 (Figura 7 e 8).

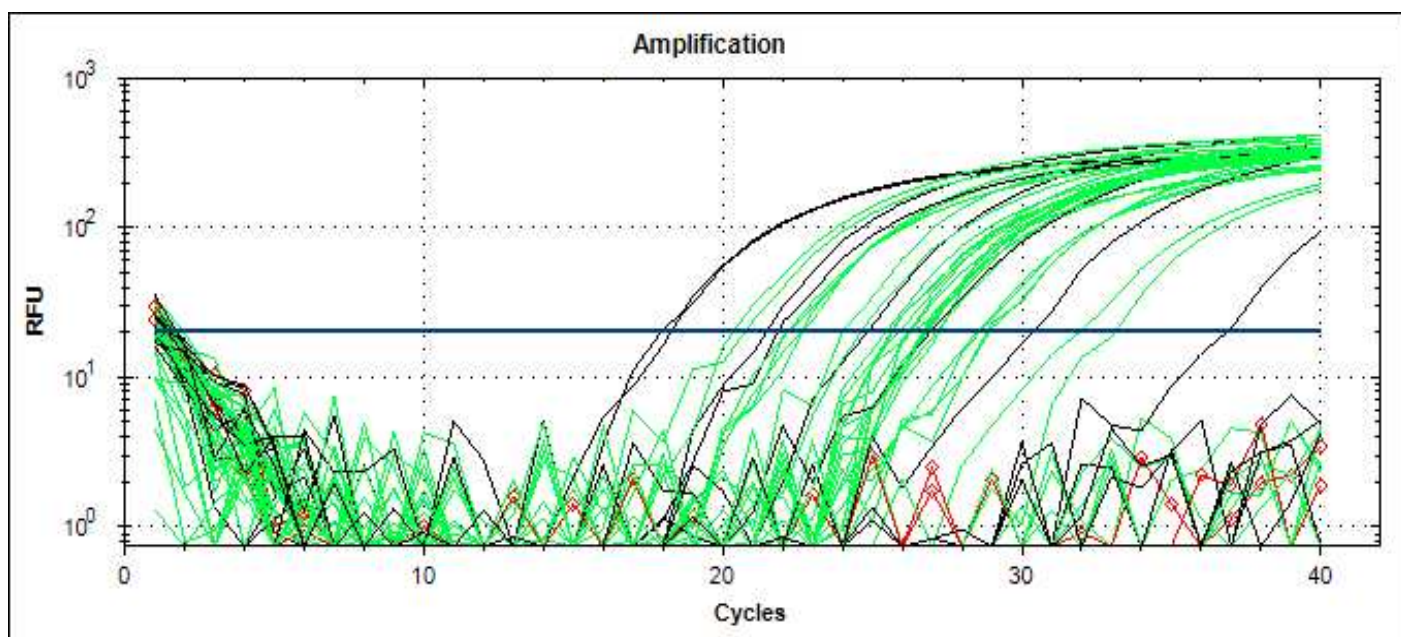


Figura 7 – Curva de amplificação das amostras do município de Itapecuru Mirim

LEGENDA DO GRÁFICO

- Curva Padrão
- Controle Negativo
- Controle Positivo

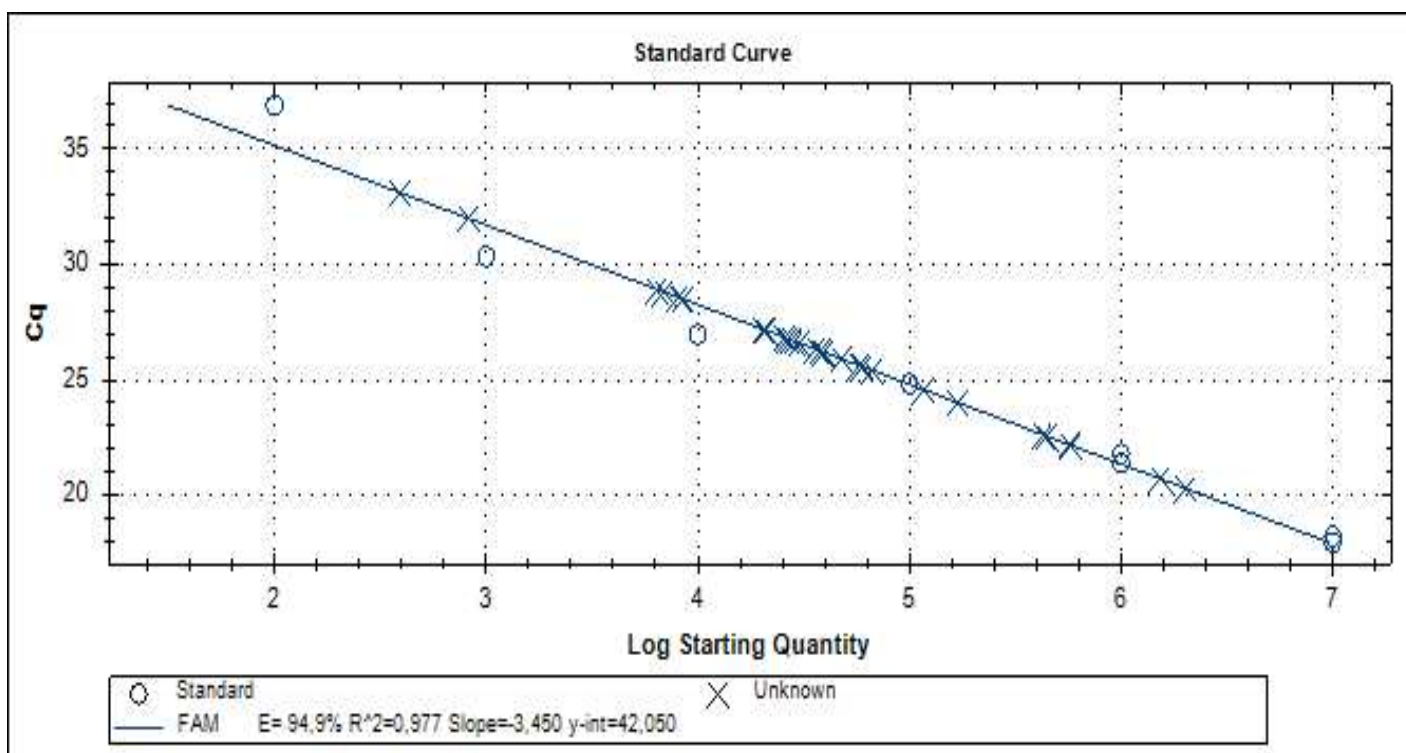


Figura 8 – Curva padrão da reação para qPCR para *M. Suis* baseada no gene 16s rRNA das amostras do município de Itapecuru Mirim.

A eficiência da qPCR foi de 91,1%, r^2 de 0,992, y int. 42,016 e *slope* de -3,555 (Figura 9 e 10).

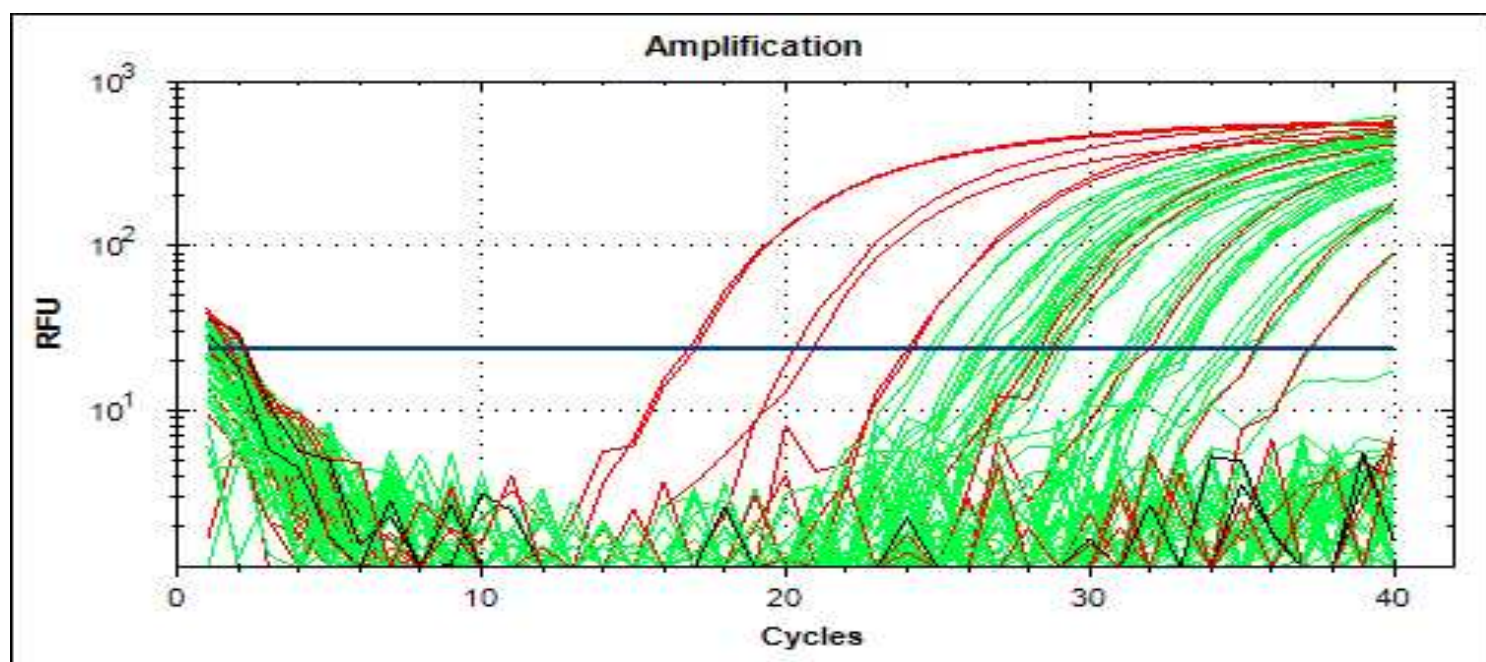


Figura 9 – Curva de amplificação das amostras do município de Santa Rita

LEGENDA DO GRÁFICO

- Curva Padrão
- Controle Negativo
- Controle Positivo

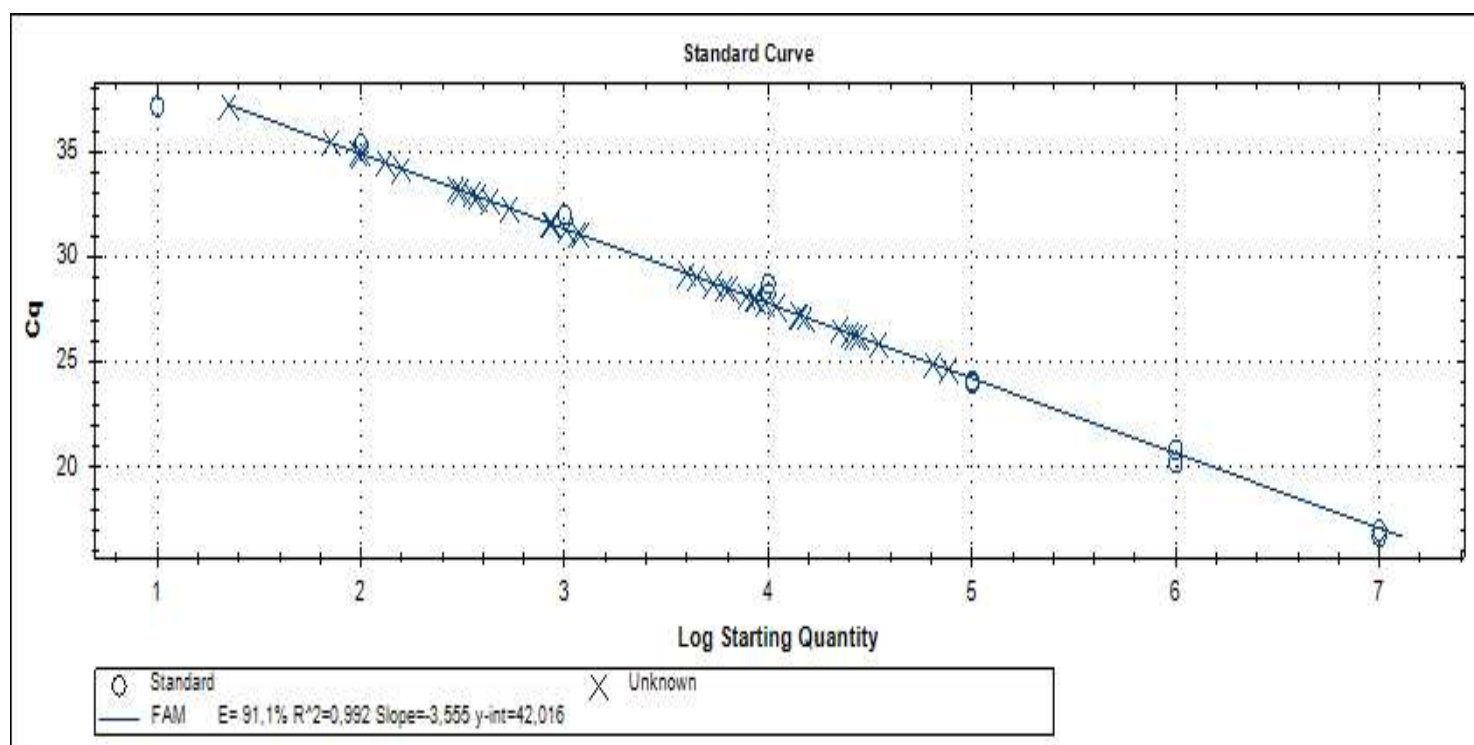


Figura 10—Curva padrão da reação para qPCR para *M. Suis* baseada no gene 16s rRNA das amostras do município de Santa Rita.

Das 40 amostras positivas na PCR convencional para o gene endógeno GAPDH sendo 17 (56,6%) em Itapecuru Mirim e 23 (65,71%) em Santa Rita e das 29 amostras foram positivas para o *Mycoplasma suis* na qPCR sendo 14 (82,35%) em Itapecuru Mirim e 15 (65,21%) em Santa Rita. Comparando-se a ocorrência do referido agente obtida no presente estudo com a encontrada por Yuan et al. (2009) na China, nota-se que os resultados apresentam poucas similaridades, devido o mesmo número de suínos amostrados, porém ambos têm um percentual de positividade alto. Esses pesquisadores encontraram uma ocorrência de 86% para o *M. suis*, por meio da PCR convencional, dentre 172 suínos amostrados em Shangai.

Já na Alemanha, Ritzmann et al. (2009) investigaram a prevalência do parasita em suínos de abate e a possível correlação entre os resultados da qPCR e dos esfregaços sanguíneos corados. Dos 1176 suínos amostrados em 196 propriedades na Alemanha, 164 (13,9%) mostraram-se positivos na qPCR para *M. suis*. Ritzmann et al. (2009), observando-se então uma menor prevalência em comparação com nosso estudo. O referido estudo demonstrou também que a avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos corados de amostras contendo 10^6 cópias de *M. suis* por ml de sangue permitiu um diagnóstico suficientemente coerente na fase aguda da doença nos suínos de abate. Contudo, em menores parasitemias (estimada pelo número de cópias/ml), a sensibilidade e a especificidade dos esfregaços sanguíneos mostraram-se baixas para poderem ser empregadas dentro de um escopo de programas de controle ou erradicação da hemoplasmoose suína. Além disso, falsos positivos em esfregaços sanguíneos são possíveis devido à dificuldade de distinção entre *M. suis* e fragmentos de DNA imaturos de estruturas eritrocitárias.

Em nosso estudo, a quantificação do fragmento do gene 16S rRNA de *M. suis* foi variável de μL , sendo considerada relativamente baixa em parte dos animais. Gerando, provavelmente, resultados negativos na análise de esfregaços sanguíneos corados. Devido à baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial das infecções por *M. suis* baseado na observação de esfregaço sanguíneo corado ao microscópio, essa técnica não gera confiabilidade nos resultados. Embora esta técnica seja de fácil execução e de baixo custo, depende da observação e da sensibilidade individual de cada pesquisador sendo assim, passível de erros. Testes sorológicos empregando proteínas recombinantes também podem ser empregados no diagnóstico de

M. suis, uma vez que apresentam elevadas sensibilidade e a especificidade (HOELZLE et al., 2007).

Hoelzle et al. (2010) investigaram a ocorrência do *M. suis* em javalis selvagens (*Sus scrofa*) de 10 áreas de caça e de um cativeiro selvagem no sudoeste da Alemanha, por meio da PCR convencional. No estudo supracitado, o parasita foi detectado em 36 (10,03%) dentre os 359 javalis amostrados, sendo que a maioria dos animais positivos eram originários de cativeiro selvagem na Alemanha (HOELZLE et al., 2010), demonstrando assim, que o percentual de positividade nesse estudo também foi menor que aquele encontrado entre os suínos dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita, MA.

Para se explicar as diferenças dos percentuais de positividade observados nos trabalhos de Hoelzle et al. (2010), Ritzmann et al. (2009) e Yuan et al. (2009) em comparado ao presente estudo, podemos analisar o tipo de criação dos suínos. As criações analisadas no experimento de Hoelzle et al. (2010) na Alemanha foram divididas em duas áreas: 10 locais de caça, onde os animais mantinham contato uns com os outros apenas por comportamento natural (cinco animais infectados – 1,39%), e um cativeiro selvagem, onde a presença de cercas e a alta densidade populacional levava a um frequente e próximo contato entre os javalis, causando um elevado aumento no percentual de positividade (31 animais infectados – 86%). Já as criações analisadas por Ritzmann et al. (2009) contemplavam 196 fazendas de suínos na Alemanha, distribuídas em três regiões, as quais representavam o sul, ocidente e oriente do país, sendo todas tecnificadas.

Porém, os suínos amostrados em nosso estudo eram oriundos de criações não tecnificadas, ou seja, criações com ausência de programas nutricionais, ambientais e instalações adequadas, genética definida e técnicas de manejo padronizadas. Apresentando condições semelhantes às de nosso estudo, os animais amostrados no trabalho de Yuan et al. (2009) provinham de fazendas comerciais de suínos, as quais apresentavam pobres condições sanitárias e, dessa forma, fornecendo um ótimo ambiente para o desenvolvimento de mosquitos do gênero *Aedes* spp. De acordo com Yuan et al. (2009), este gênero de mosquito desempenha um importante papel na transmissão de *M. suis* entre os suínos. Além disso, foi encontrado um alto percentual de positividade (49%) para o agente em estudo dentre 65 trabalhadores dessas criações. Os pesquisadores também observaram outras situações que poderiam favorecer uma

maior transmissão do agente entre os suínos, tais como a ingestão de alimento contaminado com sangue de suínos infectados e a reutilização de seringas. Portanto, esses fatores podem ter contribuído para o alto percentual de positividade da infecção por *M. suis* no estudo conduzido em Shangai, na China (YUAN et al., 2009).

Em uma análise geral dos três estudos supracitados em associação ao desenvolvido nesta pesquisa pode-se inferir que as condições sanitárias das criações têm influência nas taxas de positividade para a doença. Nas pesquisas conduzidas na Alemanha (HOELZLE et al., 2010; RITZMANN et al., 2009) a positividade foi bem menor quando comparadas a desenvolvida na China (YUAN et al., 2009) e por nossa pesquisa. Hoelzle et al. (2010) encontraram apenas 36 javalis positivos (10,03%) para o agente dentre os 359 amostrados. Os javalis que ficavam nos locais de caça mantinham contato uns com os outros apenas por comportamento natural, ou seja, a densidade populacional não era alta e tampouco o contato entre eles era forçado. Sendo assim, apenas cinco animais mostraram-se positivos. Já os javalis amostrados no cativeiro selvagem mantinham frequente e próximo contato uns com os outros, devido a presença de cercas e da alta densidade populacional. Tal ambiente favoreceu um elevado percentual de positividade (31 animais positivos dentre os 36), haja vista que um maior contato favorece a transmissão do agente. Neste caso se observa um fator de risco associado à positividade: a densidade populacional. Já as condições do ambiente, das instalações e as técnicas de manejo nos locais de caça eram adequadas e padronizadas (HOELZLE et al., 2010; RITZMANN et al., 2009). Em ambos os estudos conduzidos na Alemanha (HOELZLE et al., 2010; RITZMANN et al., 2009) os animais apresentavam genética definida e presença de programa nutricional. Entretanto, as instalações nas quais eram mantidos os javalis em cativeiro selvagem apresenta falhas, uma vez que o contato aumentou, a possibilidade de transmissão e a taxa de positividade entre eles. Contudo, ainda apresentaram menores taxas de positividade quando comparadas com aquelas encontradas no presente estudo e com o estudo de YUAN et al., (2009).

Os fatores de risco associados à positividade podem se tornar evidentes quando em condições de criações com baixas condições sanitárias. O lixo acumulado pode aumentar a presença de possíveis vetores, tais como moscas e mosquitos. Ainda, deficientes técnicas de manejo levam a falta de limpeza do local e o compartilhamento

de seringas e de outros materiais. As condições dos comedouros e bebedouros podem facilitar a contaminação de alimentos e água com sangue, saliva, secreções nasais, poeira e até mesmo urina de animais infectados, e assim, favorecendo a transmissão do agente. Portanto, mais estudos acerca dos efetivos mecanismos de transmissão do *M. suis* devem ser propostos, já que pobres condições sanitárias poderiam favorecer a transmissão do agente.

Vale ressaltar que, além da análise dos fatores de risco e das condições sanitárias, deve-se atentar para a questão da sazonalidade e das condições climáticas. De acordo com Song et al. (2014), a soroprevalência do *M. suis* em porcas na província de Hubei, China foi maior no verão e no outono quando comparada àquela observada na primavera e no inverno. Tais achados podem estar relacionados com o período de maior ocorrência dos vetores artrópodes, favorecendo a transmissão do agente. Além disso, a soroprevalência para o agente mostrou-se mais alta em porcas de reposição (40,6%), porcas multíparas (48,2%) e em javalis (44,4%), quando comparada a de leitões (13%), leitões recém desmamados (10,8%) e a de suínos em fase final de crescimento (25%). Além do mais, o tratamento medicamentoso e a frequência de desinfecção mostraram-se como fatores de prevenção da hemoplasmose. Contudo mais estudos a respeito dos fatores de risco associados à transmissibilidade e à positividade ao agente, além da sazonalidade e condições climáticas devem ser propostos para os diferentes tipos de criações de suínos.

Em nosso estudo, a positividade para *M. suis* mostrou-se elevada. Tal fato, se deve, provavelmente, à ausência de tecnificação das propriedades amostrados e das precárias condições sanitárias. Contudo, assim como observado no trabalho de Song e colaboradores (2014), pode-se inferir que a sazonalidade também pode ter sido um fator de associação a essa alta positividade obtida em nosso estudo. Em períodos com temperatura mais amena e com baixa umidade, ou seja, na primavera e no inverno, a soroprevalência das porcas na província chinesa de Hubei foi menor quando comparada àquela encontrada no do verão e outono, onde o clima é mais úmido e quente. Esse fato pode indicar que a transmissão pode ser favorecida em climas mais quentes e, devido à localização de nossa região de estudo, podemos inferir que a alta taxa de positividade foi provavelmente influenciada por mais esse fator. Guimarães et al. (2007) realizaram um estudo em Santa Catarina, região sul do Brasil, onde 121 porcas foram amostradas. Enquanto que na PCR convencional a positividade foi de 18,2%, no *Southern blotting*

foi de 33,1%. Ainda no mesmo experimento, 1,63% dentre 61 leitões, e 25% dentre quatro javalis, mostraram-se positivos para o agente. Já no Estado do Paraná, Vieira et al. (2011) verificaram ausência de positividade para *M. suis* dentre 28 suínos selvagens (*Tayassu tajacu* e *Tayassu pecari*) mantidos em cativeiro na região Sul do Brasil, por meio da análise de esfregaços sanguíneos corados e PCR convencional. Isso pode ocorrer devido a Região Sul do nosso país apresentar temperaturas mais amenas, essas baixas taxas de positivities podem ser explicadas pelas diferenças de temperatura, clima, da tecnificação e das condições sanitárias.

Recentemente, um grupo de pesquisa da UNESP encontrou alta porcentagem de positividade (76,19%) para *M. suis* pela qPCR em suínos amostrados em criações extensivas na cidade de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte (TOLEDO et al., 2016). Vemos, portanto, o quão importante é realizar a intensificação da pesquisa voltada para esse parasito, por pouco se ter esclarecido sobre ele, e pouco ou quase nada aqui do Nordeste.

Futuros estudos objetivando verificar a ocorrência do *M. suis* em criações não tecnificadas e de subsistência em outras regiões do Brasil, análise dos fatores de risco associados à infecção, positividade e susceptibilidade ao agente nas diferentes faixas etárias e a investigação do real impacto da hemoplasmosse nas esferas produtiva e sanitária em suinoculturas se faz necessário no Brasil e em nosso estado.

6. CONCLUSÕES

- O presente estudo mostra uma alta ocorrência de **(82,35%)** e **(65,21%)** de *M. suis* em suínos de criações não tecnificadas nos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita respectivamente, no estado do Maranhão.
- Notou-se, o quão crítico se encontra a situação dos municípios de Itapecuru Mirim e Santa Rita, já que o número de amostras positivas foi quase em sua totalidade, afirmando que é de suma importância a intensificação da pesquisa em mais propriedades desses municípios e de outros, já que não há dados encontrados no estado do Maranhão.
- E o emprego da técnica de QPCR nos futuros estudos a serem conduzidos a respeito da ocorrência e dos fatores de risco associados à infecção pelo *M. suis*, destacando seu baixo risco de contaminação, alto rendimento, especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e confiabilidade é importante.

REFERÊNCIAS

- BALJER, G.; HEINRITZI, K.; WIELER, L. Indirect hemagglutination for *Eperythrozoon suis* detection in experimentally and spontaneously infected swine. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B.**, Berlin, v.36, n.6, p.417-423, 1989.
- BIONDO, A. W.; DOS SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A. Review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 1-7, jul. set. 2009.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Semi nested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.9, p.4172-4177, 2003.
- BROWNBACK, A. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, Bonner Springs, v.76, n.3, p.375-378, 1981.
- CHAMIZO, C. et al. **Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 83, n. 3-4, p. 191-202, 2001.
- GRESHAM, A.; ROGERS, J.; TRIBE, H.; PHIPPS, L.P. *Eperythrozoon suis* in weaned pigs. **The Veterinary Record**, London, v.134, n.3, p.71-72, 1994.
- GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M.M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L.E. Mycoplasma suis Invades Porcine Erythrocytes **Infection and Immunity**, v. 77, n.2, 2009.
- GUIMARÃES, A.M.S.; BIONDO, A.W.; LARA, A.C.; MESSICK, J.B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **The Veterinary Record**, London, v.160, n.2, p.50-53, 2007.
- GUIMARAES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; POLETTO, R.; VEMULAPALLI, R.; SANTOS, A.P.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, L.C.; MARCHANT-FORDE, J.N.; TIMENETSKY, J.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, 2011.
- HEINRITZI, K. The diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection. **Tierärztliche Praxis**, Stuttgart, v.18, n.5, p.477-481, 1990.

HENDERSON, J.P.; O'HAGAN, J.; HAWE, S.M.; PRATT, M.C. Anemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. **The Veterinary Record**, London, v.140, n.6, p.144-146, 1997.

HENRY, S.C. Clinical observations on Eperythrozoonosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.174, n.6, p.601-603, 1979.

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

HOELZLE, L.E. Review: Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.130, n.3-4, p.215-226, 2008.

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

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

HOELZLE, K.; ENGELS, M.; KRAMER, M.M.; WITTENBRINK, M.M.; DIECKMANN, S.M.; HOELZLE, L.E. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.143, n.2-4, p.405-409, 2010.

HSU, F.S.; LIU, M.C.; CHOU, S.M.; ZACHARY, J.F.; SMITH, A.R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.53, n.3, p.352-354, 1992.

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

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

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

MAYER, M. Übereinige bakterienähnliche Parasiten der Erythrozyten bei Menschen und Tieren. **Archiv für Schiff- und Tropenhygiene**, v. 68, 1921.

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

MESSICK, J.B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potencial. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v.33, n.1, p.2-13, 2004.

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

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

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus* Mycoplasma haemofelis', '*Candidatus* Mycoplasma haemomuris', '*Candidatus* Mycoplasma haemosuis' and '*Candidatus* Mycoplasma wenyonii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.3, p.891-899, 2001.

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

RITZMANN, M.; GRIMM, J.; HEINRITZI, K.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L.E. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.133, n.1-2, p.84-91, 2009.

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

SCHULLER, W.; HEINRITZI, K.; AL-NUKTHA, S.; KÖLBL, S.; SCHUH, M. Serologic progression studies using CF and ELISA for the detection of antibodies against *Eperythrozoon suis* infection of swine. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v.103, n.1, p.9-12, 1990.

SMITH, A.R.; RAHN, T. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection in swine. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.36, n.9, p.1319-1321, 1975.

SMOLA, J.; MOLINKOVA, D.; CELER, V. *Mycoplasma haemo suis* detection by PCR in still born fetuses and weak new born pig lets. In: 20th IPVS Congress, 2008, Durban, **Proceedings...**Durban: 2008.

SONG, Q.; ZHANG, W.; SONG, W.; LIU, Z.; KHAN, M. K.; HE, L.; FANG, R.; LI, P.; ZHOU, Y.; HU, M.; ZHAO, J. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.117, n.1, p.215-221, 2014.

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

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

SPLITTER, E.J. The complement-fixation test in diagnosis of eperythrozoonosis in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.132, n.2, p.47-49, 1958.

STRAIT, E.L.; HAWKINS, P.A.; WILSON, W.D. Deescalate associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.241, n.12, p.1666-1667, 2012.

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

TOLEDO, M.A.; LEITE, A.I.; GONÇALVES, L.R.; de SOUSA, K.C.M.; do AMARAL, R.B.; da SILVA, G.C.P.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Alta ocorrência de infecção por *Mycoplasma suis* em suínos de criações não tecnificadas de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, Nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016084>, 2016.

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

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

YUAN, C.L.; LIANG, A.I. B.; YAO, C.B.; YANG, Z.B.; ZHU, J.G.; CUI, LI; YU, FEI; ZHU, N.Y.; YANG, X.W.; HUA, X.G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon*

suis) infection in swine and swine workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.70, n.7, p.890-894, 2009.

ZACHARY, J.F., BASGALL, E.J. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v.22, n.2, p.164-170, 1985.

ZACHARY, J.F.; SMITH, A.R. Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.46, n.4, p.821-830, 1985.

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