MAURÍCIO YAMAGUTI

**Isolamento de micoplasma de suínos com problemas
respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e
seqüenciamento do gene 16S rRNA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciência (Microbiologia).

**São Paulo
2009**

MAURÍCIO YAMAGUTI

**Isolamento de micoplasma de suínos com problemas
respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e
seqüenciamento do gene 16S rRNA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciência.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Yamaguti, Maurício.

Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratório e tipificação dos isolados pela PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA / Maurício Yamaguti. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jorge Timenetsky.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micoplasmas.

Versão do título para o inglês: Isolation of swine origin mycoplasma from specimens with respiratory disturbances and typification of isolates by PFGE and 16S rRNA sequencing gene.

Descritores: 1. *Mycoplasma hyopneumoniae* 2. *Mycoplasma hyorhinis* 3. Suíno 4. PCR-Multiplex 5. PFGE 6. Gene 16S rRNA I. Timenetsky, Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB22/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maurício Yamaguti.

Título da Tese: Isolamento de micoplasma de suínos com problemas
respiratório e tipificação dos isolados pela PFGE e
sequenciamento do gene 16S rRNA.

Orientador(a): Jorge Timenetsky.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas
Secretaria de Pós-Graduação
Edifício Biomédicas III
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415- CEP05508-900
Tel. (0xx11) 3091.7439 - Fax (0xx11) 3091.7423
E-mail: spgicb@usp.br

Programa: **MICROBIOLOGIA**

Interessado(a): **MAURICIO YAMAGUTI**

Assunto: Pedido para realização do Exame de Qualificação sem o parecer da CEEA do ICB

INFORMAÇÃO

A Presidência da CPG/ICB, em **25 de julho de 2008**, analisou as justificativas apresentadas e após consulta aos demais membros, aprovou '**Ad Referendum**', em **caráter extritamente excepcional** o pedido do interessado para realização do Exame de Qualificação sem o parecer da CEEA do ICB relativo ao projeto desenvolvido. Informa também que o pedido foi referendado pela CPG, em reunião realizada à 06 de agosto de 2008.

Na oportunidade, solicita que a Coordenadoria do Programa, bem como os orientadores, atentem para as normas e prazos estabelecidos pela Comissão de Pós-Graduação e Comissões de Ética em Animais e Humanos deste Instituto.

Encaminhe-se à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em **Microbiologia** para ciência dos interessados e ao Coordenador da CEEA/ICB.

CPG/ICB, 28 de agosto de 2008

Prof. Dr. JOSÉ CIPOLLA NETO
Presidente

A minha Nany, que me acompanha desde o início da minha vida acadêmica, que durante muitos anos a nossa amizade, companheirismo, cumplicidade resultou em um grande amor... e sem ela não conseguiria viver...

Te amo.

Aos meus pais Paulo e Luiza (*in memorian*) que sempre torceram e me apoiaram em todas as conquistas e aos meus irmãos Alex e Cila (*in memorian*).

A minha família de coração e agora de parentesco a Dona Réia e Sr. Oliveira, a Cássia, Bia e Carlos.

AGRADECIMENTOS

**À Deus por ter me fornecido a força e coragem para vencer
mais essa etapa da minha vida...**

À Aricelma pela colaboração, incentivo e principalmente pela convivência harmoniosa que cultiva entre os integrantes do nosso laboratório.

À Profa. Andréa Micke Moreno e as suas alunas pelo auxílio indispensável na obtenção das amostras clínicas e esclarecimentos de dúvidas.

À Profa. Márcia P. A. Mayer e alunos do laboratório de microbiologia oral em especial a Érika.

Aos professores da pós-graduação Marílis Marquez, Carlos Taborda, Benedito Correa e Flávio Auterthun pela grande oportunidade de conhecer e aprender com eles, a minha admiração.

Aos meus familiares: Cris, Ione, Tyo, Taka, Há, Elza, Clo; Massaki e Toshio, Yoshi, Will...apoio e compreensão constante.

À Melissa, grande amiga e companheira de batalha de vários anos e que sem ela não conseguiria terminar a tese, muito obrigado.

Ao Denys pela paciência e compreensão nos momentos que “peguei emprestada” a sua esposa, Melissa.

Aos meus amigos do laboratório: Ana Márcia, Ana Magda, Aricelma, Denise, Elena, Juliana, Lucas, Melissa, Marcos, Priscila e Renata pelo convívio diário, que nos proporcionou compartilharmos sonhos, problemas e soluções.

Aos amigos Jacinta, Zé e Elza, da sala de esterilização do ICB II, muito obrigado.

Às bibliotecárias da ICB – USP, em especial, Eva, Maria, Teresinha e Valéria, pela atenção e simpatia na orientação sobre a formatação da Tese.

Às secretárias da microbiologia Alice, Naíde e Aninha pela feliz convivência e auxílio prestado durante todos esses anos.

A CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual este estudo não seria possível.

A todos não mencionados, que viabilizaram de alguma forma o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Jorge Timenetsky pela orientação,
amizade e confiança depositada em mim.

Muito obrigado

"Sempre que pensamos em mudar
queremos tudo o mais rápido possível.

Não tenha pressa, pois as pequenas
mudanças são as que mais importam. Por
isso, não tenha medo de mudar
lentamente, tenha medo de ficar parado".

Provérbio chinês

RESUMO

YAMAGUTI, M. **Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA.** 145 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As doenças respiratórias são responsáveis, na suinocultura, por grandes perdas econômicas e entre os agentes destacam-se os micoplasmas. Foram coletadas 126 amostras de muco nasal/tonsilar, e fragmentos de 78 pulmões, 2 de traquéia e 2 de tonsila. No isolamento foi utilizado o meio FRIIS modificado, na identificação, a Multiplex-PCR e na tipificação, a PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA. Foram obtidos 59 isolados identificados como *M. hyopneumoniae* (1,70%), *M. flocculare* (3,40%) e *M. hyorhinis* (94,90%). A PFGE dos isolados de *M. hyorhinis*, resultou em 10 e 9 perfis com a enzima *AvaI* e *XhoI*, respectivamente. O seqüenciamento do gene 16S rRNA dos isolados *M. hyorhinis* apresentaram baixo polimorfismo quando comparados entre si e com a cepa de referência. A seqüência do gene 16S rRNA do isolado de *M. hyopneumoniae*, quando comparada a seqüência da cepa J e os isolados 7448 e 232, resultaram em polimorfismo. O *M. hyopneumoniae* continua sendo o mais difícil de isolar. Os dendrogramas obtidos da PFGE resultaram em grande heterogeneidade entre os isolados de *M. hyorhinis*. O seqüenciamento do gene 16S rRNA permitiu o estudo de variabilidade interespecífica e intraespecífica dos isolados de micoplasmas.

Palavras-chaves: *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Mycoplasma hyorhinis*; Suínos; PFGE, Multiplex-PCR; gene 16S rRNA.

ABSTRACT

YAMAGUTI, M. **Isolation of swine origin mycoplasmas from specimens with respiratory disturbances and typification of isolates by PFGE and 16S rRNA sequencing gene.** 145 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Economic losses in swine production are common due the respiratory diseases in these animals. *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* are the most frequent microbial agents. The aim of this study was recover this isolates in Friis medium, indentify them by Multiplex PCR and detect their genotypic variations by PFGE and sequencing the 16s rRNA gene. One hundred twenty six swabs from tonsil and nasal mucus of swine with respiratory disturbances were analyzed. It was included 78 lungs, two trachea and two tonsils. It was obtained 59 isolates; 1.70% of *M. hyopneumoniae*, 3.40% of *M. flocculare* and 94.90% of *M. hyorhinis*. The PFGE of *M. hyorhinis*, allowed obtain 10 profiles with enzyme *Ava*I and nine profiles with *Xho*I. A low polymorphism of gene 16sRNS was detected in *M. hyorhinis* isolates when compared with the type strain at the GenBank. The *M. hyopneumoniae* isolates resulted in polymorphisms when comparated with strain J, 7448 and 232. *M. hyopneumoniae* is still the most difficult to isolate. *M. hyorhinis* isolates of different herds showed a large heterogenicity with enzymes *Ava*I e *Xho*I. The sequencing of gene 16S rRNA allowed analyse the interespecífic and intraespecífic variations of mycoplasmas isolated.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Mycoplasma hyorhinis*; Swine; PFGE; Multiplex-PCR; 16S rRNA gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	“Primers” da PCR-Multiplex, com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho dos produtos amplificados, esperados para cada espécie. MHYOP: <i>M. hyopneumoniae</i> ; MHYOR: <i>M. hyorhinis</i> ; MFLOC: <i>M. flocculare</i> ; MYrev: reverse, For: forward.....	63
Quadro 2 -	“Primers” F16S/R16S utilizados na reação da PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto esperado.....	67
Quadro 3 -	“Primers” RCO3/RCO4 utilizados na reação da PCR e seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto esperado e localização no gene 16S rRNA.....	68
Quadro 4 -	Programas de eletroforese compostos por um ou dois estágios, com diferentes pulsos e tempo de corrida, utilizados na padronização da PFGE.....	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Colônias de <i>Mycoplasma</i> spp. (aumento de 10X em microscópio estereoscópico, objetiva 40), com e sem “núcleo”, isoladas de material biológico de suínos em meio sólido FM. A, B, C: colônias atípicas (sem núcleo); D, E, F: colônias típicas (com núcleo).....	71
Figura 2 -	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR-Multiplex (subunidade 16S rRNA) utilizando “primers” MHYOP, MYOR, MFLOC, MYrev, a partir do DNA extraído dos isolados. Coluna 1 a 13: amostras positivas para <i>M. hyorhinis</i> . Coluna 14: controle positivo <i>M. flocculare</i> . Coluna 15: controle positivo <i>M. hyorhinis</i> . Coluna 16: controle positivo <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. flocculare</i> . Coluna 17: controle negativo das reações com água ultra-pura. PM: padrão de peso molecular de DNA – 200 bp.....	72
Figura 3 -	PFGE (Programa IV, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído do subcultivo da cepa de referência <i>M. flocculare</i> (ATCC 27716), digerido pela enzima Aval e eletroforese com Thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: sedimento celular lavado com tampão glicosado. Coluna 2: sedimento celular lavado tampão PBS. PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).....	74
Figura 4 -	PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído do subcultivo das cepas de referência e isolado de <i>M. hyorhinis</i> , digerido pelas enzimas Aval, Bamh, XbaI, XhoI. Colunas 1 a 4: DNA da cepa de referência (<i>M. hyopneumoniae</i>) com Aval, Bamh, XbaI, XhoI, respectivamente; Colunas 5 a 8: DNA da cepa de referência (<i>M. hyorhinis</i>) com Aval, Bamh, XbaI, XhoI, respectivamente; Colunas 9 a 12: isolado de <i>M. hyorhinis</i> com Aval, Bamh, XbaI, XhoI, respectivamente, PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).....	75
Figura 5 -	PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e isolado de <i>M. hyorhinis</i> digerido pelas enzimas XhoI, PstI, Aval e Nae. Colunas 1, 3 e 5: DNA da cepa de referência com XhoI, PstI, Aval respectivamente; Colunas 2, 4, 6 e 7: DNA do isolado com XhoI, Aval, PstI, e Nae, respectivamente, PM: Marcador Low Range PFG (0,13 a 194 Kpb).....	76
Figura 6 -	PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído do subcultivo das cepas de referência de <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. hyorhinis</i> e isolados de <i>M. hyorhinis</i> e <i>M. flocculare</i> , digerido pela enzima SmaI. Colunas 1, 2 e 4: cepas de <i>M. hyopneumoniae</i> ; Colunas 3 e 7: cepas <i>M. hyorhinis</i> ; Coluna 5: Isolado de <i>M. hyorhinis</i> ; Coluna 6: isolado de <i>M. flocculare</i> PM: Marcador Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).....	77
Figura 7 -	PFGE com diferentes programas de eletroforese, com um ou dois estágios, testados na padronização da separação dos fragmentos de DNA, da cepa de referência e isolados de <i>M. hyorhinis</i> , digerido pela enzima Aval. A: Programa I; B: Programa II; C: Programa III; D: Programa IV; E: Programa V; F: Programa VI.....	79
Figura 8 -	PFGE (Programa VI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e dos isolados de <i>M. hyorhinis</i> , digerido pela enzima Aval e eletroforese com Thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 5: DNA de isolados de fragmentos de pulmão; Coluna 6: DNA de isolado de fragmento de tonsila; coluna 7: DNA de isolado de fragmento de traquéia; Colunas 8 e 9: DNA de isolados de muco nasal; Coluna 10: DNA da cepa de referência de <i>M. hyorhinis</i> (ATCC 17981); PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 242.5 Kpb)...	80

Figura 9 -	PFGE (Programa VI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e isolados de <i>M. hyorhinis</i> , digerido pela enzima <i>XhoI</i> e eletroforese com Thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 6: DNA de isolados de fragmento de pulmão; Colunas 7 a 9: DNA de isolados de muco nasal; Coluna 10: DNA da cepa de <i>M. hyorhinis</i> (ATCC 17981); PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).....	81
Figura 10 -	Dendrograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA da cepa de referência e isolados de <i>M. hyorhinis</i> , digerido pela enzima <i>AvaI</i> . F: frigorífico, P: propriedade. Seta: ponto de corte "Cluster".....	82
Figura 11 -	Dendrograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA da cepa e isolados de <i>M. hyorhinis</i> , digeridos pela enzima <i>XhoI</i> . F: frigorífico, P: propriedade. Seta: ponto de corte "Cluster".....	84
Figura 12 -	A: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando "primers" universais F16S/R16S, das cepas de referência (<i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> e <i>M. flocculare</i>) e isolados de <i>M. hyorhinis</i> . Colunas 1 a 6: DNA dos isolados de <i>M. hyorhinis</i> ; Colunas 7 a 9: DNA das cepas de referências; Coluna 10: controle negativo da reação com água ultra pura; PM: peso molecular de DNA – 100 bp. B: Eletroforese em gel de agarose dos produtos purificados, obtidos na PCR com os "primers" F16S/R16S, das cepas de referências (<i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> e <i>M. flocculare</i>) e isolados de <i>M. hyorhinis</i> (colunas 1 a 9); ML: Mass ladder...	85
Figura 13 -	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos, das cepas de referências e isolados de micoplasma, obtidas pelo sequenciamento com o "primer" F16S. No quadro em destaque, região homóloga nas espécies de micoplasmas analisadas, escolhida para o "primer" RCO3.....	87
Figura 14 -	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos, das cepas de referências e isolados de micoplasma, obtidos pelo sequenciamento com o "primer" R16S. No quadro em destaque, região homóloga nas espécies de micoplasmas analisadas, escolhida para o "primer" RCO4.....	88
Figura 15 -	Representação da localização dos "primers" RCO3/RCO4 na região interna do gene 16S rRNA, seqüenciado pelos "primers" F16S/R16S, para obtenção de aproximadamente 1500 pb deste gene.....	89
Figura 16 -	Localização dos "primers" F16S e R16S (preto) e RCO3 posição 335 pb 5'→3' e RCO4 posição 1041 pb 3'→5' (cinza) na seqüência completa do gene 16S rRNA do <i>M. hyorhinis</i> (GenBank nº EU714234).....	89
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando "primers" RCO3/RCO4, a partir do DNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas. Colunas 1 a 4: isolados de micoplasmas; Colunas 5 a 7: cepas de referência; Coluna 8: controle negativo da reação com água ultra pura; Coluna 9: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp	90
Figura 18 -	Dendrograma das relações genéticas entre as seqüências parciais do gene 16S rRNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas obtidos pela PCR com "primers" RCO3/RCO4 e seqüências disponíveis no GenBank. Seta: ponto de corte ≥ 97%.....	92
Figura 19 -	Dendrograma das relações genéticas entre as seqüências dos genes 16S rRNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas obtidos pela PCR com "primers" F16S/R16S e RCO3/RCO4 e seqüências disponíveis no GenBank. Seta: ponto de corte ≥ 97%.....	94

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Espécies de micoplasma do GenBank e seus respectivos números de identificação, utilizadas no alinhamento do gene 16S rRNA para a formação do dendrograma.....	69
Tabela 2 -	Frequência de isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp., obtidos em meio sólido FM, segundo sítio anatômico de coleta e número de animais, provenientes da região de São Paulo e Capital e norte do Paraná, no período de 2005 a 2007.....	71
Tabela 3 -	Frequência de isolados identificados pela PCR-Multiplex (<i>M. hyorhinis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. flocculare</i>), segundo material biológico do sítio anatômico de suínos provenientes da região de São Paulo e Capital e norte do Paraná, no período de 2005 a 2007.....	73
Tabela 4 -	Cepas de referência (<i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> e <i>M. flocculare</i>) e isolados de <i>M. hyorhinis</i> submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S para a amplificação e seqüenciamento completo do gene 16S rRNA.....	85
Tabela 5 -	Polimorfismo e inserções no gene 16S rRNA da cepa ATCC 17981 e isolados de <i>M. hyorhinis</i>	95
Tabela 6 -	Posições de polimorfismo e deleções no gene 16S rRNA das cepas de <i>M. hyopneumoniae</i> e isolado.....	97
Tabela 7 -	Polimorfismo, inserções e deleções no gene 16S rRNA da cepa <i>M. flocculare</i> (acesso X62699).....	98

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Base nucleotídica adenina
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão de cérebro e coração (brain heart infusion)
C	Base nucleotídica citosina
CDRS	Complexo da Doença Respiratória Suína
CNPISA	Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves
DNA	Ácido desoxirribonucleico ou ADN
dNTP	Desoxirrinucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	Enzyrna-linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
FM	FRIIS modificado
<i>g</i>	Gravidade
G	Base nucleotídica guanina
g	Grama
GPMD	ganho de peso médio diário
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
m ²	metros quadrados
m ³	metros cúbitos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MFLOC	<i>Mycoplasma. Flocculare</i>
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHYOP	<i>M. hyopneumoniae</i>
MHYOR	<i>Mycoplasma. Hyorhinae</i>
min	Minuto

mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MYrev	Mycoplasma reverse
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NPPC	National Pork Producers Council
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia de polimerase (Polimerase chain reaction)
PCS	Pneumonia Catarral Suína
PES	Pneumonia Enzoótica Suína
PFGE	Gel de eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
pmol	Picomol
PMS	Pneumonia Micoplasmática Suína
PO	organismo pleomórfico
PPCB	pleuropneumonia contagiosa bovina
PPLO	.PleuroPneumonia-Like Organisms
s	Segundo
SRRS	vírus da Síndrome Respiratória Reprodutiva em Suínos
T	Base nucleotídica timina
TAE	Tris-acetato EDTA,
TBE	Tris Base, Ácido bórico, EDTA,
TE	Tris Base, EDTA
TEB	Tris, EDTA, ácido bórico
ton	tonelada
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
EU	União Européia
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UPGMA	Unweighted Paired Group Method using Arithmetic
UV	luz ultravioleta
V/cm	Volts por centímetro
mg	Micrograma
μL	Microlitro
Mm	Micrometro
μM	Micromolar
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
10x	10 vezes a concentração de uso
5'→3'	Sentido de transcrição
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Importância da suinocultura na economia brasileira.....	23
2.2 Introdução à suinocultura brasileira.....	28
2.2.1 Classificação das doenças infecciosas na suinocultura.....	29
2.3 Doenças respiratórias em suínos.....	31
2.3.1 Fatores de riscos associados a doenças respiratórias.....	32
2.3.1.1 Ambientais.....	33
2.3.1.2 Características do hospedeiro.....	34
2.3.1.3 Agentes Etiológicos.....	35
2.3.2 Doenças respiratórias bacterianas.....	35
2.4 Mollicutes.....	36
2.4.1 Histórico.....	37
2.4.1.1 <i>Mycoplasmas</i> suínos.....	37
2.4.2 Taxonomia e Filogenia.....	39
2.4.3 Genética.....	43
2.4.4 Características gerais dos mollicutes.....	45
2.4.5 Nutrição.....	47
2.4.6 Habitat.....	49
2.4.7 <i>Mycoplasma</i> em suínos.....	49
2.4.7.1 <i>M. hyosynoviae</i>	50
2.4.7.2 <i>M. hyorhinis</i>	50
2.4.7.3 <i>M. hyopneumoniae</i>	53
2.4.7.4 Diagnóstico.....	54
2.4.7.5 Tipificação.....	56
3 OBJETIVOS.....	59
3.1 Geral.....	59
3.2 Específicos.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 Cepas de referência.....	60
4.2 Meios de cultura.....	60

4.3 Amostras clínicas.....	60
4.4 Cultivo de <i>Mycoplasma</i> spp. de amostras clínicas.....	61
4.5 PCR-Multiplex.....	62
4.5.1 Extração de DNA.....	62
4.5.2 PCR-Multiplex para identificação de <i>M. hyopneumoniae</i> , <i>M. hyorhinis</i> e <i>M. flocculare</i>	62
4.5.3 Detecção do produto amplificado.....	63
4.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	63
4.6.1 Obtenção do sedimento de micoplasma.....	64
4.6.2 Extração do DNA	64
4.6.3 Digestão enzimática.....	65
4.6.4 Padronização dos programas de eletroforese para PFGE.....	65
4.6.5 PFGE da cepa e isolados clínicos de <i>M. hyorhinis</i>	66
4.6.6 Análise da PFGE.....	66
4.7 Seqüenciamento dos nucleotídeos.....	67
4.7.1 Otimização da PCR com “primers” F16S e R16 e seqüenciamento do gene 16S rRNA	67
4.7.2 Desenvolvimento dos “primers” RCO3/RCO4 e seqüenciamento	68
4.7.2.1 Padronização da PCR com “primers” RCO3/RCO4.....	68
4.7.3 Análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA	69
5 RESULTADOS.....	70
5.1 Isolamento.....	70
5.2 PCR-Multiplex.....	72
5.3 Padronização da PFGE.....	73
5.3.1 Digestão enzimática.....	75
5.3.2 Padronização dos programas de eletroforese.....	77
5.3.3 PFGE da cepa de referência e isolados de <i>M. hyorhinis</i>	80
5.3.4 Análise da PFGE da cepa e isolados de <i>M. hyorhinis</i> obtidos com a enzima Aval	81
5.3.5 Análise da PFGE da cepa e isolados de <i>M. hyorhinis</i> com a enzima <i>Xho</i> I.....	83
5.4 Seqüenciamento.....	85
5.4.1 PCR com “primers” F16S/R16S.....	85

5.4.2 Padronização da PCR com “primers” RCO3/RCO4.....	89
5.4.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	90
5.4.4 Alinhamento das regiões amplificadas.....	90
5.4.5 Análise do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA	91
5.4.6 Análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA	92
6 DISCUSSÃO	99
7 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS	137

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro, atualmente, representa mais de 35% do Produto Interno Bruto (PIB), emprega 30% da população economicamente ativa e responde por 40% das exportações (BARROS, 2006; MAPA, 2007). A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas de agronegócio, cresceu significativamente nos últimos quinze anos. O Brasil é o quarto maior produtor, sendo responsável por 3,0% da produção mundial. Em 2006, a exportação de carne suína atingiu 528 mil toneladas (ton), representando U\$ 1 bilhão. Isto se atribui à suinocultura brasileira, considerada uma das mais desenvolvidas do mundo.

A forma de produção de suínos passou por diversas mudanças para atender às necessidades de mercado, como a alteração no modelo de criação extensiva para intensiva, que resultou em exacerbação das doenças multifatoriais. Acredita-se que a maior parte das perdas econômicas na suinocultura esteja relacionada a essas doenças, destacando-se as enfermidades respiratórias principalmente a pneumonia enzoótica suína (PES) e a rinite atrófica.

As doenças respiratórias em suínos geralmente é resultado da interação de diferentes bactérias e/ou vírus patogênicos, que também são influenciados por fatores ambientais ou condições sanitárias do animal infectado. No Complexo da Doença Respiratória Suína (CDRS), que acomete principalmente animais de crescimento e terminação, freqüentemente são identificados *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* e o *M. hyorhinis*, em adição a patógenos potenciais como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, Vírus da Influenza e Circovirus suíno tipo 2.

Desde o primeiro isolamento de micoplasma na França, por Edward Nocard em 1898, a presença destes microrganismos como competitivo na microbiota residentes em tecidos, de humanos e animais, vem representando um desafio na sua compreensão como comensais ou patógenos primário/secundário.

O diagnóstico laboratorial e clínico fornece informações para a compreensão da dinâmica das infecções e prevalência das enfermidades por micoplasmas. A utilização de vacinas inativadas com *M. hyopneumoniae*, como ferramenta no controle da PES, não previne a colonização desses microrganismos nos pulmões, mas induz uma proteção parcial, que resulta na diminuição da extensão de lesões

macroscópicas (MAES et al., 1999). As diferenças de virulência, encontrada entre os isolados de *M. hyopneumoniae*, e/ou a presença de outros patógenos, como *M. hyorhinis*, pode resultar em falhas no controle da PES, quando da utilização de vacinação em granjas. O isolamento e cultivo de micoplasmas, associados a problemas respiratórios, possibilitam estudos moleculares, epidemiológicos e profiláticos para a compreensão da enfermidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância da suinocultura na economia brasileira

Na década de cinquenta, Ray Goldberg e John Davis, economistas da Universidade de Harvard criaram o conceito de “agribusiness”, em decorrência das grandes transformações tecnológicas observadas na agricultura mundial (AMADOR, 1999). Estas transformações levaram a formação dos complexos agroindustriais fazendo com que o “agricultor moderno” passa-se a se especializar em áreas de cultivo e criação, deixando outras atividades, como armazenamento, processamento e distribuição, serem realizadas por organizações além de sua fazenda (MEGIDO e XAVIER, 1998; AMADOR, 1999; PIZOLATTI, 2004).

Na década de sessenta, com a revolução agrícola e a importação de pacotes tecnológicos, iniciaram-se no Brasil os agronegócios. Com isso, as atividades agrícolas e pecuárias começaram a fazer parte de uma complexa cadeia produtiva, que envolvia desde a fabricação de insumos, produção nas fazendas, assistência técnica, industrialização, exportação até o consumidor final (AMADOR, 1999).

Atualmente, o Brasil é o maior exportador de café, açúcar, etanol, suco de laranja, carnes bovina e avícola, além de disputar com os Estados Unidos a liderança nas vendas do Complexo Soja (MAPA, 2007). A produção das atividades agropecuárias, no agronegócio, é cada vez mais controlada por conglomerados econômicos internacionais (CAMPOS e CAMPOS, 2007), no entanto, o Brasil tornou-se competitivo, desalojando concorrentes importantes e enfrentando restrições aos produtos, que vão desde a fixação de cotas e aumentos tarifários até adoção de barreiras sanitárias e ambientais. Dentro desse universo do agronegócio surge a suinocultura, uma atividade que propicia ótimas oportunidades de investimentos e possibilita a transformação de cereais (milho e soja), resíduos e alimentos não convencionais em carne nobre com alto valor proteico (AMADOR, 1999).

Segundo estimativas do “National Pork Producers Council” (NPPC), para cada tonelada (ton) de carne suína exportada é agregado 3,53 ton de milho, transformando as exportações de carne em incremento nas exportações de grãos (AMADOR, 1999). A importância da suinocultura também pode ser avaliada através

da análise de seu mercado mundial, que indica ser a carne mais consumida no mundo (SANTOS, 2005). No Brasil, o consumo de carne suína ocorre 75% na forma de produtos industrializados, vendidos a preços superiores aos da carne *in natura*, o que representa substancial retorno financeiro aos diferentes agentes econômicos envolvidos na cadeia produtiva (ZYDEK, 1997).

A suinocultura brasileira cresceu significativamente nos últimos quinze anos, considerando indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado mundial, número de empregos diretos e indiretos, tornando-a uma cadeia de produção competitiva (GONÇALVES e PALMEIRA, 2006; TALAMINI e FERREIRA, 2006).

Em 2006, a carne suína brasileira foi responsável por 3,0% da produção mundial, representando 3,23 milhões de ton. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, após a China, União Européia (UE) e Estados Unidos (EUA). Anualmente, são produzidos aproximadamente 24 suínos terminados por matriz, que alcançam a média de 100 kg em um período de 160 dias (VIELMO, 2008). Essa produtividade pode ser comparada aos índices da Irlanda (26,4 leitões/matriz), Itália (24,0), Holanda (20,9) e Canadá (20,7), comprovando os avanços técnicos da produção nacional (ANUALPEC, 2002).

O Brasil exporta apenas 18% da produção de carne suína, o que confirma o seu potencial para uma maior participação na produção mundial (VIELMO, 2008). A suinocultura brasileira é praticada com maior ou menor intensidade em diferentes estados, embora aproximadamente 40% estejam concentradas na região Sul. Nesta região existem cerca de 20,5 milhões de cabeças, sendo 27,4% no Paraná, 29,6% no Rio Grande do Sul e 43% em Santa Catarina (ABIPECS, 2007).

O crescimento do rebanho suíno brasileiro manteve-se praticamente constante, enquanto o número de matrizes suínas decresceu nos últimos dez anos (GONÇALVES e PALMEIRA, 2006). Entretanto, a produção de leitões aumentou significativamente, passando de 22,4 milhões, em 1993, para quase 30 milhões, em 2002. A diminuição do número absoluto de matrizes, associado ao aumento de leitões, reflete os avanços tecnológicos implementados na produção, o que resultou na maior produtividade do plantel de suínos (TALAMINI e FERREIRA, 2006).

O alto nível tecnológico alcançado pela suinocultura brasileira atual, que coloca o país entre os principais produtores e exportadores de carne suína, exige um estrito controle sanitário que garanta a abertura dos mercados para os produtos

brasileiros (DAL BEM, 2008). Nesse contexto, a produção brasileira de carne suína vem crescendo acima da média dos demais países produtores. Em 1993, o Brasil produziu o equivalente a 1.250 mil ton, representando menos de 2% da produção mundial, colocando-o na décima segunda posição entre os maiores produtores. Em 2001, a produção nacional de 2.117 mil ton, equivalente a 2,5% da produção mundial, proporcionou-lhe a sexta posição. Nesse período, entre os doze maiores produtores, o Brasil obteve maior aumento de produção, aproximando-se de 70% (ANUALPEC, 2002; TALAMINI e FERREIRA, 2006).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), o crescimento anual de consumo de carnes no mundo até o ano 2015 deverá alcançar 2%, sendo que uma parcela deste percentual deverá ser atendida via expansão da produção de suínos.

Com base na análise dos problemas e potencialidades dos grandes produtores mundiais, o Brasil apresenta amplas possibilidades de se firmar como grande fornecedor de proteína animal. A produção brasileira apresenta baixo custo e carcaças de qualidade, quando comparada aos grandes exportadores. Dessa forma, o mercado internacional sinaliza para o crescimento das exportações brasileiras, com possibilidades de abertura de novos mercados como NAFTA, China, África do Sul e Chile. A produção de carne suína brasileira destinada ao Mercado Europeu merece atenção especial, assim como do ingresso no mercado japonês, que é o maior importador mundial (EMBRAPA, 2003).

A suinocultura brasileira é uma atividade organizada e presente em 50% das propriedades rurais existentes no país. O Brasil tem, atualmente, um plantel de aproximadamente 35.945 milhões de cabeças e estima-se que 400 mil pessoas dependam diretamente da cadeia produtiva da suinocultura (IBGE, 2008). O valor da cadeia produtiva da suinocultura é estimado em U\$1,8 bilhões. Em 1970, o plantel era de 31,5 milhões de cabeças e, a produção, de 705 mil ton. Em 2006, com 32 milhões de cabeças, a produção aumentou para 2,825 milhões de ton, portanto, em 36 anos, o crescimento do plantel de 1,6% resultou no aumento de 300% na produção. Estes números indicam a evolução tecnológica do setor nesse período, resultado do trabalho de técnicos e criadores nas áreas da genética, nutrição e manejo (IBGE, 2003; DAGA et al., 2007). Assim, o Brasil vem se consolidando como um importante “player” no mercado mundial de carne suína e com potencial para ampliar sua participação relativa nesse mercado. Como consequência, a cadeia produtiva tem se organizado no sentido de atender a demanda do mercado externo

e prospectar novos mercados. A exportação passou a ter importância significativa na produção de suínos, pois absorve a produção excedente, amplia a produção interna e possibilita melhor remuneração para a atividade (GONÇALVES e PALMEIRA, 2006).

A carne suína, fonte de proteína animal mais importante no mundo, representa quase metade do consumo de produção de carnes, com mais de 94 milhões de ton (USDA, 2006), das quais aproximadamente 53% são da China, e outro terço da UE e EUA. O Brasil é o quarto maior produtor (2,9% do total) e o sexto consumidor em termos absolutos (2,2% do total). Os maiores consumidores, per capita, são países europeus, norte-americanos e China, nos quais a população tem tradição deste consumo (MIELE e VALQUIR, 2007). Entre estes três principais produtores e consumidores há um elevado grau de auto-suficiência, ou relação consumo/produto, levando a uma baixa participação (aproximadamente 27%) da carne suína nas exportações mundiais de proteína animal. Os maiores importadores são Japão, Federação Russa e México, com aproximadamente 60% das importações mundiais. A UE lidera as exportações, seguida por EUA, Canadá e Brasil (USDA, 2006).

O desempenho brasileiro na última década é significativo, com crescimento de 84% na produção e 1,615% nos volumes exportados, atingindo a marca recorde de US\$1,2 bilhões exportados em 2005 (ABIEPCS, 2006). A trajetória de incremento tecnológico, aumento da escala, especialização e coordenação entre os elos da cadeia produtiva foram fatores fundamentais no desempenho brasileiro nesse segmento do mercado mundial de carnes (MIELE e VALQUIR, 2007). Entretanto, a participação crescente de novos países no cenário internacional, assim como as incertezas sanitárias e a prática de protecionismo, resulta em processo de acirramento na concorrência internacional que podem afetar negativamente estes resultados (LIDDELL e BAILEY, 2001; SANTINI e SOUZA FILHO, 2004; MIELE e VALQUIR, 2007).

A sanidade ou saúde é um dos pilares de sustentação da produção intensiva de suínos, uma vez que seu objetivo é diminuir riscos e reduzir custos. Para tanto, exigem-se medidas de biossegurança, medicações profiláticas, programas de vacinação, de limpeza e de desinfecção, entre outras (SEBRAE, 2008).

A estrutura da produção de suínos nos países industrializados tem se modificado nos últimos anos. O aumento das populações confinadas, associado a

fatores de manejo e ambiental, como temperatura, umidade e presença de amônia, e fatores inerentes ao animal, como estresse e imunidade, contribuíram para o aumento das enfermidades respiratórias (CHRISTENSEN et al., 1999; COSTA et al., 2004). As doenças respiratórias, mais freqüentemente diagnosticadas nos sistemas convencionais de produção de suínos, são rinites atrófica, pneumonias e a pleuropneumonias. Segundo Sobestiansky et al. (1987), a rinite atrófica e as pneumonias causam prejuízos significativos à suinocultura, devido a sua cronicidade nos rebanho e à falta de esclarecimento dos produtores com relação às medidas de controle. As perdas econômicas decorrentes dos problemas respiratórios são decisivas para os produtores e a indústria. Sobre os produtores, em consequência dos gastos com medicamentos, redução do desenvolvimento corporal dos animais comprometidos e mortalidade; sobre a indústria, pela condenação de carcaças, especialmente no caso da pneumonia e pleuropneumonia (PIFFER e BRITTO, 1993).

Paralelamente ao aumento da produtividade que a modernização da suinocultura tem conquistado, a intensificação da produção, aliada à exploração de animais geneticamente mais exigentes e mais sensíveis a doenças, tem resultado no aumento da incidência das doenças multifatoriais. Estas enfermidades, embora sejam causadas por agentes infecciosos definidos, possuem seu desencadeamento condicionado à existência de uma série de fatores predisponentes (DAL BEM, 2008). Acredita-se que 75% ou mais das perdas econômicas em uma granja de suínos estejam relacionadas às doenças multifatoriais (SOBESTIANSKY et al., 1999). Dentre estas, destacam-se as respiratórias, pela alta prevalência nos rebanhos suínos e pelas perdas econômicas por elas determinadas, como as condenações de carcaças nos matadouros.

Entre as enfermidades do sistema respiratório, a broncopneumonia e a pneumonia afetam diretamente a produção suína mundial (CHRISTENSEN et al., 1999). As doenças respiratórias em suínos raramente têm como causa um único patógeno e na maioria dos casos, resultam da interação de várias bactérias e/ou vírus patogênicos, que também são influenciados por fatores ambientais ou condições sanitárias do animal infectado (PALZER, 2008). O CDRS é uma síndrome típica que afeta suínos de 16 a 22 semanas, caracterizada por baixa conversão alimentar, retardo no crescimento, anorexia, febre, tosse e dispnéia (HALBUR, 1998; THACKER, 2001).

O *M. hyopneumoniae* e o *M. hyorhinis* são freqüentemente identificados no CDRS, em adição a patógenos potenciais como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, Vírus da Influenza e Circovirus suíno tipo 2 (HALBUR, 1998; THACKER, 2001; HARMS et al., 2002; KIM et al., 2003). Entretanto, Palzer et al. (2008) isolaram *Mycoplasma* spp de suínos, com sinais clínicos de pneumonia, em maior freqüência quando comparado a outros agentes, comprovando o papel dessas espécies como agente primário da pneumonia e da broncopneumonia.

2.2 Introdução à suinocultura brasileira

No Brasil, em 1532, o navegador Martim Afonso de Souza trouxe os primeiros suínos para o litoral paulista (São Vicente/SP) e 50 anos após, no Governo Tomé de Souza, já havia muitos animais nas terras hoje paulistas e baianas. As raças existentes em Portugal foram as primeiras introduzidas e criadas no Brasil. Do tipo ibérico, vieram as raças Alentejana e Transtagana; do céltico, Galega, Bizarra e Beiroa; e do asiático, Macau e China. Estas raças se cruzaram desordenadamente com outras originárias da Espanha, Estados Unidos, Itália, Inglaterra e Holanda. Posteriormente, alguns fazendeiros, preocupados com o melhoramento da produção suína nacional, selecionavam raças que iam surgiam naturalmente. Porém, somente no início do século XX, com a importação de animais das raças Berkshire, Tamworth e Large Black e, posteriormente, das raças Duroc e Polland China, todas provenientes da Inglaterra, iniciou-se o melhoramento genético nacional. No período de 1930 a 1940 chegaram às raças Wessex e Hampshire, em 1950 a Landrace e, na década de 60, os Large White, também da Inglaterra. O melhoramento genético apresentava-se inovador, com a entrada dos primeiros animais híbridos da Seghers e PIC, na década de 70 (SEBRAE, 2008).

O uso da carne de porco na cozinha brasileira, datada da época do descobrimento do Brasil, esteve incorporado à cozinha mineira desde os primórdios de sua história. Sabe-se que a mão-de-obra existente naquela época era destinada, em sua grande maioria, às atividades mineradoras e pouco ao plantio ou a criação de animais. Entretanto, a facilidade do manejo alimentar de suínos com restos de alimentos, acrescidos de produtos nativos como bananas e inhame, resultaram em

grandes criações destinadas a produção de banha, torresmo, carnes, lingüiça e lombo nas Minas Gerais do século XVIII (SEBRAE, 2008).

Desde a sua domesticação até os dias de hoje, os suínos passaram por grandes modificações no modelo de criação (SOBERSTIANSKY et al., 2001a). A suinocultura brasileira, até os anos 50, estava alicerçada em sistemas extensivos, com utilização quase que exclusivamente de raças nacionais produtoras de banha, que resultavam em baixos índices zootécnicos. A crescente procura por animais mais produtivos e com baixo percentual de gordura na carcaça foi uma das causas da redução do número e eliminação de suínos que não satisfaziam este padrão de mercado (SILVA FILHA et al., 2005).

No início do processo de domesticação, os suínos eram criados extensivamente, em grandes áreas, com alimentação à base de forragens, frutos e raízes (LEITE et al., 2006). Hoje, os suínos em sua grande maioria, são confinados em instalações e recebem alimentação composta por milho, farelo de soja e trigo e suplementos de complexos vitamínicos e minerais. Um animal que demorava 12 meses para atingir o peso ideal é abatido atualmente aos 5 ou 6 meses de idade, com baixo percentual de gordura e aproximadamente 90 Kg (BORGES, 1993). A modificação no modo de criação de suínos se deve à intensificação da agricultura, que proporcionou a substituição das criações extensivas para as de confinamento (FERREIRA e LIMA, 2001; MARIANTE et al., 2003; SILVA FILHA, 2005). Desde então, os problemas sanitários têm sido uma preocupação constante de técnicos e produtores, tanto pela morte de animais e gastos com medicamentos, como pela redução nos índices produtivos. As tecnologias de produção na suinocultura moderna vêm provocando grandes mudanças no equilíbrio da saúde dos rebanhos. Atualmente, um dos grandes problemas das criações suinícolas são as enfermidades que acometem o sistema respiratório, digestivo, nervoso e reprodutivo, e que se relacionam com a maioria das doenças infecciosas (SOBESTIANSKY et al., 2001a; SONCINI, 2007).

2.2.1 Classificação das doenças infecciosas na suinocultura

Na suinocultura moderna, as doenças que afetam os animais podem ser alocadas em dois grandes grupos (MORÉS, 2000):

- a) doenças epizooticas: causadas por agentes infecciosos específicos que se caracterizam por apresentar alta contagiosidade e altas taxas de morbidade e mortalidade;
- b) doenças multifatoriais de etiologia complexa, denominadas doenças enzoóticas ou Doenças de Rebanho: um ou mais agentes infecciosos exercem seu efeito patogênico em animais ou rebanhos submetidos a situações de risco.

As doenças multifatoriais tendem a permanecer nos rebanhos de forma enzoótica, com alta taxa de morbidade e baixa taxa de mortalidade, mas com impacto econômico acentuado, devido a seu efeito negativo sobre os índices produtivos do rebanho. As doenças enzoóticas existem na maioria das granjas tecnificadas de produção de suínos, e o objetivo maior é mantê-las em nível baixo de ocorrência para diminuir o impacto nos índices produtivos (MORES e ZANELLA, 2006).

Estudos epidemiológicos têm identificado fatores de risco que favorecem a ocorrência de doenças multifatoriais nas diferentes fases de criação de suínos. O conhecimento desses fatores de risco é importante no estabelecimento de medidas de controle para evitá-los ou corrigi-los (EMBRAPA, 2003).

As doenças respiratórias em suínos, difundidas na maioria das granjas brasileiras, se apresentam de forma enzoótica, causando severos prejuízos econômicos. A produção em larga escala tem se tornado um fator agravante, pois favorece a disseminação das infecções pulmonares e resulta no baixo desempenho zootécnico dos animais acometidos (HILL et al., 1992; SILVA et al., 2002), gastos com medicamentos (VEENHUIZEN, 1998) e condenações de carcaças em abatedouros (MARTÍNEZ et al., 2006; MÓRES, 2006).

Entre 1996 a 1999, de um abate nacional de 33%, as condenações devido à presença de lesões envolvendo o pulmão e pleura foram de 0,639%, entretanto, a prevalência de lesões pulmonares é bem maior. Em 1999, de avaliações realizadas em abatedouros, foram obtidos um percentual de 49,4 para rinite atrófica (RA) e 54,8 para lesões pneumônicas e, em 2001, 78,14% para RA e 75,4% para pneumonias. Na inspeção de 17.202 pulmões e 1.863 cornetos em frigoríficos, da região Sul dos estados de São Paulo e Minas Gerais, foram registrados prevalências de

aproximadamente 75,7% para as lesões pneumônicas e 78,10% para as RA (MORÉS e ZANELLA, 2006).

2.3 Doenças respiratórias em suínos

Com a evolução do conceito de medicina veterinária preventiva, cada vez mais os veterinários, suinocultores, consultores técnicos e as agroindústrias têm se conscientizado da importância de se obter informações corretas e constantes a respeito do estado sanitário dos rebanhos suinícolas (SILVA, 2001).

Um dos maiores problemas enfrentados pela suinocultura industrial mundial são as enfermidades que acometem o sistema respiratório de suínos nas diferentes fases de produção (STAKENBORG, 2005). Um grande número de patógenos está presente nas granjas brasileiras e são distintos quanto à epidemiologia, diagnóstico e controle.

As doenças respiratórias ocupam lugar de destaque dentro dos complexos patológicos que afetam os suínos, devido à frequência e intensidade com que atingem os rebanhos e às perdas econômicas que causam. Elas são consideradas multifatoriais, pois a sua frequência e grau de severidade dependem não somente da(s) característica(s) do(s) agente(s) e da imunidade do rebanho, mas também das condições ambientais em que são criados os animais (SOBESTIANSKY et al., 1987).

O exame patológico em frigoríficos, em lotes de suínos abatidos, tem sido utilizado na avaliação da ocorrência e severidade das doenças respiratórias crônicas em rebanhos suínos (MORÉS et al., 1999), com a finalidade de identificar e quantificar a prevalência das doenças, bem como a severidade das lesões (PIFFER et al., 1991; PIFFER, 1997). Nos matadouros, as lesões pneumônicas destacam-se como as principais causas de condenação e aproveitamento condicional de carcaças. Aproximadamente 50% de todas as condenações são causadas por pneumonias (DAL BEM, 2008). Vários estudos demonstram a correlação entre os diferentes graus de atrofia dos cornetos nasais e pneumonia e o ganho de peso em suínos. Assim, um animal com atrofia grave ou completa dos cornetos apresenta uma redução no ganho médio diário de peso (GMDP) de 17%. Nos casos de pneumonia, com área de hepatização pulmonar igual ou acima de 50%, observa-se

uma redução de até 30% GMDP (SOBESTIANSKY et al., 1987). Estima-se uma perda de 37,4 g/dia de ganho de peso para cada 10% de hepatização pulmonar (PIFFER e BRITO, 1993). Quando os animais apresentam, simultaneamente, atrofia completa dos cornetos e 50% ou mais da área pulmonar comprometida, o GMDP é reduzido em até 40% (SOBESTIANSKY et al., 1987).

O exame patológico em frigoríficos, apesar de ser eficiente na identificação de lesões macroscópicas e permitir a correlação com o ganho de peso, apresenta algumas desvantagens na sua aplicabilidade, como a presença de veterinário com experiência em avaliações patológicas e intervenções durante a inspeção na linha de abate, que resultam em contratempo na rotina do frigorífico.

Como alternativa, pode ser usada a metodologia de contagens de espirros, que tem como vantagem a fácil aplicabilidade, sem custo aos produtores e ainda permitir uma avaliação clínica do rebanho, no entanto, é indicada somente para doenças respiratórias crônicas em suínos em fase de crescimento/terminação. Este método é uma ferramenta útil na monitoria de ocorrência de pneumonia e rinite atrófica, por apresentar uma correlação positiva entre tosse/pneumonia e espirro/rinite atrófica (MORES et al. 1999).

Em condições comerciais, dificilmente um suíno alcança o peso ideal de abate sem ter adquirido algum tipo de doença respiratória, que é sem dúvida, um dos principais fatores limitantes à rentabilidade da atividade suinícola (SILVA, 2001).

2.3.1 Fatores de risco associados a doenças respiratórias

A modernização e intensificação da criação de suínos ampliaram a possibilidade de ocorrência de doenças infecciosas, favorecendo o surgimento das Doenças de Rebanho. Fatores como o aumento do tamanho das granjas e do número de animais por baia, problemas com o fluxo de produção e transporte de animais, redução no tempo de vazio sanitário, alterações na genética, concentração de animais em determinadas áreas geográficas, aumento crescente de contaminação em rações por micotoxinas e falhas de biossegurança criaram condições favoráveis à emergência de muitas infecções, até então consideradas de

baixa importância, e a perpetuação ou aumento das já existentes na suinocultura (BARRAGRY, 1991; BARCELLOS et al., 2007).

As doenças respiratórias, apesar de serem estudadas e discutidas há bastante tempo, vêm mantendo a sua importância na suinocultura, embora sejam intensos os esforços no seu controle (KICH e PONTES, 2001; STAKENBORG, 2005). Estas doenças, principalmente as pneumonias, são causas de perdas em produtividade, mortes e condenações de carcaças nas inspeções sanitárias (HILL e JONES, 1984; SILVA et al., 2002). As causas geralmente são complexas, com interações entre agentes infecciosos e fatores ambientais, resultando na supressão dos mecanismos de defesa pulmonares com subsequente doença clínica. Em alguns casos, resulta em morte; em outros, pode progredir e regredir durante a vida dos animais, tendo um efeito prejudicial na taxa de crescimento (TAYLOR, 1996; MÓRES, 2006). Quando as doenças respiratórias se desenvolvem nas criações intensivas de suínos, seu nível de intensidade não depende somente da presença do agente etiológico, mas do conjunto de fatores de risco ou circunstâncias desfavoráveis existentes nesse ambiente, que provocam distúrbios na regulação dos mecanismos fisiológicos ou imunológicos (SOBESTIANSKY et al., 2001a).

Segundo Dall Costa et al. (2000), em estudo epidemiológico observacional, foram identificados vários fatores de risco para a alta ocorrência de doenças respiratórias, como a pneumonia e rinite atrófica. A probabilidade de ocorrência dessas doenças aumenta quando os agentes estão amplamente disseminados, a epidemiologia é complexa e as modernas técnicas de produção (altas densidades, genéticas de alto desempenho, etc.) favorecem o aparecimento e a sua propagação (SILVA, 2001). Esse conjunto de fatores de risco pode ser dividido em ambientais, características do hospedeiro e agente etiológico.

2.3.1.1 Ambientais

No Brasil, os fatores de risco relacionados às doenças respiratórias em suínos foram estudados por Dall Costa et al. (2000). A densidade de animais superior a 01suíno/0,85 m², ausência de cortinas e janelões, volume de ar disponível menor que 3m³/suíno e excesso de poeira ambiental foram os principais fatores (MÓRES, 2006).

A intensificação da criação de suínos, em confinamento, implica em aumento populacional de animais por área e, em muitas ocasiões, em manejo inadequado - superpopulação das instalações associada a um ambiente adverso -, que geram condições desfavoráveis e exacerbam as doenças respiratórias (SOBESTIANSKY et al., 2001a). A densidade está diretamente associada à rentabilidade das instalações, porém a sua influência no aparecimento dos processos clínicos pode ser observada quando se diminui drasticamente a densidade por metro quadrado. A densidade de 0,8 a 1,0 m²/suíno, para 100 kg de peso vivo, é recomendada (SILVA, 2001), pois a alta densidade animal numa instalação ou movimentação insuficiente de ar cria condições favoráveis à transmissão de agentes patogênicos entre os animais doentes e sadios (SOBESTIANSKY et al., 2001a). Uma ventilação inadequada influencia na presença dos gases tóxicos e interfere diretamente na funcionalidade do sistema respiratório (SILVA, 2001), como a amônia, que pode atuar como fator predisponente às pneumonias (HAMILTON et al., 1996).

O manejo nutricional deve ser realizado em comedouros adequados e suficientes para evitar o estresse alimentar dos suínos, com fornecimento de rações que não resultem em formação de pó, além de serem livres de contaminantes como micotoxinas (SILVA, 2001). A fumonisina, micotoxina produzida pelo *Fusarium (moniliforme) verticillioides* presente no milho, pode promover a imunossupressão, favorecendo o aparecimento de infecções subclínicas do sistema respiratório (HALLOY, 2005).

O conhecimento das necessidades ambientais dos animais, o estudo das condições climáticas da região e o desenho arquitetônico com o uso de dispositivos adequados nas construções têm como objetivo maximizar o conforto dos animais (SARTOR et al., 2004).

2.3.1.2 Características do hospedeiro

Os surtos de pneumonia em sistemas modernos de criação de suínos são mais severos que os descritos antigamente (SCHWARTZ, 2001). Isto provavelmente está relacionado à variação no nível de imunidade nas fases de creche, crescimento e terminação. A uniformidade imunológica dos lotes é ponto crítico no controle das patologias respiratórias, pois composições de lotes com animais de diferentes

origens e faixa etárias favorecem o aparecimento de enfermidades e, conseqüentemente, piores resultados zootécnicos (SILVA, 2001; SOBESTIANSKY et al., 2001a).

2.3.1.3 Agentes Etiológicos

Os principais agentes envolvidos nas doenças respiratórias são: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *M. hyopneumoniae* e *Salmonella cholerasuis*, podendo ocorrer ainda interação com os vírus da Síndrome Respiratória Reprodutiva em Suínos (SRRS), Aujeszky, Influenza e Peste Suína. As doenças respiratórias existem, em grande parte, nas granjas comerciais produtoras de suínos (KICH e PONTES, 2001).

O CDRS é o conjunto de alterações fisiológicas, que acarreta perdas econômicas significativas, caracterizada por crescimento lento, diminuição da conversão alimentar, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia (THACKER et al., 2000; THANAWONGNUWECH et al., 2004; SCOFANO, 2006; YAMAGUTI et al., 2008). Essa síndrome incide em todas as regiões do mundo onde ocorre a suinocultura, apesar da sanitização contínua como medida de controle (DUBOSSON et al., 2004). O termo CDRS tem sido adotado para descrever uma doença respiratória grave, que se desenvolve como resultado da combinação de patógenos bacterianos e/ou virais (SCOFANO, 2006), evidenciado principalmente em animais nas fases de crescimento e terminação (BACCARO et al., 2005).

2.3.2 Doenças respiratórias bacterianas

Todas as granjas de suínos possuem animais portadores de algum potencial patógeno para o sistema respiratório, que pode ser classificado em primários ou secundários (STEVENSON, 1998; KICH e PONTES, 2001).

Os agentes primários infectam o pulmão, via respiratória, e causam a enfermidade quando inoculados experimentalmente via intra-traqueal, como o *M.*

hyopneumoniae (PE), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleuropneumonia) e *Bordetella bronchiseptica* (rinite atrófica) (DONE, 1997).

Os agentes secundários não produzem a doença quando inoculados experimentalmente via intra-traqueal e requerem alteração nos mecanismos de defesa do sistema respiratório para se multiplicarem e causarem a doença. Entre os principais agentes secundários estão: *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *M. hyorhinis* e *Actinomyces pyogenes*, além dos agentes que alcançam o pulmão via hematógena, devido a septicemias, como a *Salmonella choleraesuis*, *Actinobacillus suis* e *Actinomyces pyogenes* (KICH e PONTES, 2001).

As infecções múltiplas são comuns e resultam em agravamento do quadro clínico. Fonseca et al. (1999), estudando pulmões de suínos provenientes de granjas comerciais do Rio Grande do Sul, encontraram as seguintes associações: *M. hyopneumoniae* e *Pasteurella multocida*; *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Streptococcus sp.*; *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida*.

Entre os principais agentes responsáveis pelas enfermidades no sistema respiratório em suínos, merecem destaque os micoplasmas pertencentes à classe *Mollicutes* (YAMAGUTI et al., 2008). A PE ocorre como resultado da ação primária do *M. hyopneumoniae* associada à ação de bactérias secundárias (SILVA, 2001; SOBESTIANSKY et al., 2001). De acordo com Thacker et al. (1999), a incidência e a severidade da PE tem uma relação diretamente proporcional com a ocorrência de infecções pelo vírus da Influenza e o da SRRS. Atualmente, o *M. hyorhinis* vem sendo responsabilizado como agente primário nas pneumonias em suínos (LIN et al., 2006; PALZER et al., 2008;) e, adicionalmente, existem descrições deste patógeno associado à SRRS (GOYAL, 1993; KOBAYASHI et al., 1996; GIRARD et al., 2001; KAWASHIMA et al., 2007).

2.4 Mollicutes

A importância das infecções por micoplasmas (*Mollicutes*) em animais é histórica e persiste na atualidade, interferindo na agropecuária e pesquisas biomédicas (BUZINHANI et al., 2007).

2.4.1 Histórico

O primeiro micoplasma foi descrito há mais de cem anos, em 1898 na França, por Edward Nocard e Emile Roux, em animais com pleuropneumonia contagiosa bovina (PPCB). A partir desta data, microrganismos semelhantes aos da PPCB foram descobertos por outros pesquisadores em diferentes hospedeiros. Estes microrganismos foram denominados genericamente de “PleuroPneumonia-Like Organisms” ou PPLO. Em 1929, o gênero *Mycoplasma* foi introduzido para designar estes microrganismos, atualmente classificados como membros da família *Mycoplasmataceae*, ordem *Mycoplasmatales*, classe *Mollicutes*. Ao longo dos anos e com a expansão das pesquisas nas áreas de microbiologia humana, animal, ambiental, das plantas e dos insetos, cerca de 200 novas espécies foram descobertas e classificadas segundo suas características fenotípicas e genotípicas (RAZIN e TULLY, 1983; WOESE, 1987; JOHANSSON e PETTERSSON, 2002; METTIFOGO, 2003)

2.4.1.1 *Micoplasmas em suínos*

A pneumonia em suínos é reconhecida há quase 100 anos. Algumas características da doença e do agente etiológico começaram a surgir na Europa e Estados Unidos no período de 1931 até o final de 1950 (ROSS, 1991). Shope (1931), em 1931 isolou o vírus causal da Influenza Suína (IS) e reproduzindo a doenças. Entre 1933 e 1936 (KOBÉ, 1933) foi reconhecida e descrita outra enfermidade respiratória em suínos, denominada Ferkelgrippe. Durante vários anos, não foi possível diferenciar o agente etiológico das duas enfermidades.

No ano de 1938, Momberg-Jorgensen descreveu uma pneumonia transmitida por um agente filtrante proveniente de lesões pneumônicas de suínos, que ele acreditava ser distinto do agente responsável pela IS (GOODWIN e WHITTLESTONE, 1963).

Entre 1948 a 1949 foi possível diferenciar as enfermidades Ferkelgrippe e IS. Gulrajani e Beveridge (1951), por meio de inoculação experimental em suínos, com filtrados livres de bactérias obtidos de suspensões de pulmões com lesões de pneumonia, reproduziram a doença, indicando a presença de um agente filtrante.

Estes pesquisadores demonstraram que a pneumonia crônica era distinta da IS, pois a influenza era praticamente inexistente na Europa e, portanto, a maioria dos problemas respiratórios em suínos deveria corresponder a outro agente etiológico viral - que mais tarde ficaria conhecido como pneumonia enzoótica. A maioria dos pesquisadores subseqüentes concordou com esta hipótese. Entretanto, a observação de que a tetraciclina prevenia o estabelecimento da infecção fez ressurgir o questionamento sobre a possibilidade de um agente etiológico alternativo (GOODWIN e WHITTLESTONE, 1963).

Wesslén e Lannek (1954), utilizando-se de cultivos celulares, descreveram a citopatogenia do agente da pneumonia enzoótica, mas estas culturas não produziram lesões macroscópicas compatíveis com pneumonia quando inoculadas em suínos. Partículas homogêneas obtidas de culturas, quando visualizadas em microscopia, aglutinavam-se ao serem submetidas ao soro de coelho previamente imunizado com material proveniente de casos de pneumonia enzoótica (LANNEK e WESSLÉN, 1955).

Entre 1955 e 1963, o agente da pneumonia suína foi isolado e cultivado em ovos embrionados de galinha, cultivos celulares e meios de cultivo bacteriano. Em inoculações experimentais com leitões, estes isolados foram capazes de produzir lesões macro e microscópicas características de pneumonia viral (MARE e SWITZER, 1965). Alguns pesquisadores acreditavam que o isolado obtido era o agente da PE e sugeriram que poderia ser um PPLO.

Whittlestone, entre 1957 e 1958, encontrou evidências de um organismo pleomórfico (PO) com características tintoriais e morfológicas semelhantes ao PPLO em diversos isolados de PE. Ele descreveu a técnica de preparação à fresco de tecido com lesões de pneumonia para reconhecer o organismo e sugeriu que este agente era o responsável pela PE (GOODWIN e WHITTLESTONE, 1963; MARE e SWITZER, 1965).

Mare e Switzer (1965) e Goodwin et al. (1965) conseguiram isolar e caracterizar um micoplasma que denominaram *M. hyopenumoniae* e *M. suipneumoniae*, respectivamente. Em 1967, Goodwin et al. demonstraram que se tratava do mesmo agente. Posteriormente, a Comissão Internacional de Micoplasmas decidiu como nomenclatura aceita *M. hyopneumoniae* (PIJOAN, 1976).

O nome *M. hyorhinis* foi sugerido pela primeira vez em 1955, após Switzer (1955) reproduzir pericardites, pleurites e peritonites por meio de inoculação

experimental em suínos, com um isolado proveniente de cavidade nasal de suínos com rinite atrófica, e confirmar uma nova espécie de micoplasma patogênico para suínos. Dinter et al. (1965), estudando isolados obtidos de suínos, identificaram o *M. hyorhinis* e o responsabilizaram como o agente da PE.

Após dezessete anos da descoberta do *M. hyorhinis*, Meyling e Friis (1972) isolaram e identificaram uma nova espécie de micoplasma em suínos, por meio de inibição de crescimento e metabólica. A nova espécie, denominada *M. flocculare*, apresentava morfologia de colônia semelhante ao *M. hyopneumoniae*, mas temperatura ótima de crescimento de 30 °C, que indicava que o trato respiratório alto provavelmente seria o seu habitat natural, sendo confirmado posteriormente através da inoculação experimental em suínos (Friis, 1972).

Desde o primeiro isolamento até os dias de hoje, o *M. hyopneumoniae* (GOODWIN et al., 1965; MARE e SWITZER, 1965;) e *M. hyorhinis* (DINTER et al., 1965) têm sido descritos em diversos países como agentes envolvidos em patologias do sistema respiratório, causando importantes perdas econômicas na suinocultura e representando um desafio no controle dessas doenças.

2.4.2 Taxonomia e Filogenia

A classificação dos organismos vivos foi um tema de grande interesse para os cientistas que pesquisavam a História Natural na Europa apartir do século XVI. Lineu propôs um sistema binomial, que é uma das bases da classificação atual dos organismos. A Taxonomia se tornou uma profissão durante o século XIX, resultando em um rápido aumento no número de animais e plantas terrestres conhecidos (THOMPSON et al., 2005). Esta ciência produziu um sistema estável, predizível e altamente informativo, que tem colaborado no avanço de diferentes ramos da ciência, incluindo não somente a microbiologia, mas também a genômica, ciências médicas, ecologia de microrganismos, biotecnologia, evolução e epidemiologia (ROSSELLO-MORA, 2005).

A taxonomia de bactérias, em geral, esteve em estado de fluxo por mais de 100 anos, pois os sistematas davam grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas nos antigos esquemas de classificação, resultando na

formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e, muitas vezes, artificiais (THOMPSON et al., 2005).

A proposta e subsequente aplicação massiva da taxonomia polifásica (genotípica/ fenotípica) a partir de 1970, utilizando a técnica de hibridização de DNA-DNA (COLWELL, 1970), produziu grupos taxonômicos robustos que foram, posteriormente, posicionados no espaço filogenético, com o auxílio de seqüências do 16S rRNA (THOMPSON et al., 2005). Uma variedade de características ecológicas e fenotípicas associadas ao uso da homologia DNA-DNA, freqüentemente usada na classificação de microrganismos, foi denominada taxonomia polifásica por Colwell (1970). A taxonomia polifásica tem como objetivo classificar microrganismos por meio da integração de diferentes tipos de dados e informações. Isto inclui dados fenotípicos (testes bioquímicos, composição de ácidos graxos, entre outros), dados genotípicos (métodos baseados em padrões de fragmentos de DNA diferentes) e dados filogenéticos (seqüências de genes ribossomais) (VANDAMME et al., 1996).

Estudos de filogenia molecular utilizando o gene 16S rRNA nos procariotos e 18S nos eucariotos, realizados por Woese (1987) e Woese et al. (1990), transformaram a dicotomia eucarioto/procarioto em um sistemas de três domínios: *Bacterias*, *Archaea* e *Eucaria*. Atualmente, muitos caracteres fenotípicos e genotípicos indicam que os eucariotos e as arqueobactérias formam um grupo-irmão com a exclusão das eubactérias. Entre as evidências que sugerem esta ancestralidade comum entre as arqueobactérias e eucariotos, estão a ausência de uma parede bacteriana, presença de proteínas semelhantes às histonas associadas ao DNA, moléculas semelhantes a esteróides em um grupo de arqueobactérias (Eócitos) e semelhança de várias proteínas e vias metabólicas (OLIVEIRA e MENCK, 2004). Cavalier-Smith (1987) sugeriu que os eucariotos teriam surgido de uma linhagem de bactérias que perdeu a habilidade de formar uma parede celular de mureína e, em substituição, teria surgido o citoesqueleto para manter a estrutura rígida.

A taxonomia molecular envolve o estudo dos ácidos nucléicos microbianos, principalmente DNA cromossômico e RNA ribossômico, para a obtenção de informações taxonômicas (GOODFELLOW e O'DONNELL, 1993). As informações derivadas de ácidos nucléicos podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos hierárquicos, desde o estabelecimento

de relações intra-específicas entre linhagens, até relações entre espécies, gêneros e níveis taxonômicos supra genéricos (VIANEZ JÚNIOR, 2005). Hoje, a estrutura da taxonomia de bactérias é baseada na filogenia do 16S rRNA (LUDWIG e KLENK, 2001). Há aproximadamente 6500 espécies de bactérias formalmente descritas, que representam, no entanto, menos de 1-10% de toda a biodiversidade de bactérias detectadas no meio ambiente, indicando uma necessidade premente de pesquisa nesta área (THOMPSON et al., 2005).

A natureza dos mollicutes tem representado um desafio na compreensão de sua biologia, classificação e taxonomia. Esses procariotos pertencem à Divisão Tenericutes e à Classe *Mollicutes* - *molli* (suave); *cutes* (cútis ou derme) - nomenclatura associada à ausência de parede celular e do peptidoglicano, sendo seu citoplasma envolto somente pela membrana trilaminar que apresenta como constituinte o colesterol, composto presente somente em células animais. O nome “micoplasma” (*mykes*: fungo/filamentos; *plasma*: forma) foi usado para denotar os microrganismos da classe *Mollicutes*, mas sugeriu-se o termo mollicutes, como nome trivial, para designar qualquer microrganismo desta classe, e micoplasma quando referido aos membros do gênero *Mycoplasma* (RAZIN, 1992).

A taxonomia destas bactérias está periodicamente sendo atualizada. A classe *Mollicutes* é composta por cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*) e 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*). Devido ao estudo comparativo de genomas microbianos, os gêneros *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium* foram incluídos aos mollicutes. Originalmente, muitas destas bactérias pertencentes às antigas riquetsias (algumas não cultiváveis) foram agrupadas como hemoparasitas, causadores principalmente de anemias em alguns animais (JOHASSON e PETTERSSON, 2002). Nos gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Eperythrozoon* e *Haemobartonella*, encontram-se os mollicutes de maior interesse na área veterinária.

Os micoplasmas distinguem-se fenotipicamente de outras bactérias pelo seu pequeno tamanho e ausência da parede celular. Taxonomicamente, a ausência da

parede celular é o critério utilizado para separar os micoplasmas de outras bactérias e classificá-los na classe *Mollicutes* (RAZIN, 1998). Fenotipicamente, por meio da coloração de Gram, os *Mollicutes* são considerados bactérias Gram-negativas, uma vez que possuem somente a membrana plasmática, sem proteção adicional de uma parede celular (ROTTEN, 2003). Entretanto, os mollicutes pertencem a um braço da árvore filogenética das bactérias Gram-positivas devido ao baixo conteúdo C+G (MANILOFF, 1992). Este braço é formado pelos grupos *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus* e duas espécies de *Clostridium* (*C. innocum* e *C. ramosum*). O ancestral dos mollicutes originou-se do braço filogenético do *Streptococcus*, há cerca de 600 milhões de anos atrás, provavelmente de um microrganismo com genoma aproximado de 2000 Kpb. A partir desse ancestral, originaram-se dois braços, formados por microrganismos com genoma de 1500 a 1700 Kpb (*Anaeroplasma*, *Asteroplasma* e *Acholeplasma*) e o outro com tamanhos entre 600 a 1400 kpb (*Spiroplasma*, *Entomoplasma* e *Mycoplasma*) (RAZIN et al., 1998; MANILOFF, 2002). Esta redução genômica está relacionada à perda de genes que sintetizam a parede celular e vias metabólicas (LABARÈRE, 1992).

Os primeiros sistemas de classificação de procariontes eram baseados apenas em algumas propriedades fenotípicas e governaram por décadas a taxonomia microbiana, fornecendo informação descritiva para a estruturação de diversos grupos taxonômicos bacterianos. Nos últimos 40 anos, com o desenvolvimento nas áreas de química, biologia molecular, estatística e informática, a taxonomia de microrganismos vem passando por contínua alteração em direção a um sistema de relações evolutivas entre os microrganismos (THOMPSON et al., 2005).

Estudos, utilizando modificações na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), têm resultado em fontes de dados adicionais sobre o tamanho genômico, importante na taxonomia. A relação de citosina e guanina (C+G) no DNA de procariotos é um efetivo parâmetro taxonômico e está incluso entre os testes para a definição de novas espécies de *Mollicutes* (RAZIN, 1998). Sequências de nucleotídeos proporcionam valiosas informações na determinação das relações genéticas entre diferentes bactérias e servem como base no estabelecimento de espécies. Devido à importância das seqüências do 16S rRNA, filogenia, taxonomia, quanto na identificação das espécies de mollicutes, o Comitê de Taxonomia em *Mollicutes* recomenda a inclusão da seqüência do 16S rRNA em quaisquer

descrições de novas espécies desta classe. Embora as seqüências do 16S rRNA tenham sido ferramentas eficientes na filogenia e taxonomia dos *Mollicutes*, sugere-se a utilização de outros marcadores filogenéticos como: *tuf*, *hsp70*, *ftsZ*, *uvrC*, *rnpB* e *rpoB*, e seqüências intergênicas do 16S-23S rRNA para fundamentar e complementar os dados obtidos com as seqüências completas do 16S rRNA (RAZIN, 2006).

2.4.3 Genética

As informações genéticas dos mollicutes estão contidas na molécula circular de DNA, que possui as menores informações genômicas conhecidas. Estas informações podem ser utilizadas para dividir as bactérias em dois grupos: um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, com genoma aproximadamente de 600 a 1350 Kpb e outro pelos gêneros *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*, com 790 a 2200 Kpb (HERRMANN, 1992).

A simplicidade genômica está correlacionada aos dados filogenéticos que indicam um processo de evolução degenerativa das eubactérias Gram-positivas, envolvendo reduções das informações genéticas que estavam presentes em suas antecessoras. Os mollicutes perderam a parede celular, algumas vias metabólicas e, provavelmente, parte da maquinaria genética molecular, simplificando especialmente a replicação do DNA e sistemas de reparos (LABARÈRE, 1992).

Os genomas são caracterizados por possuírem baixo conteúdo de C+G, variando entre 24 e 33 mol%, com exceção de algumas espécies que possuem cerca de 56 mol%. Existe apenas uma a duas cópias de genes rRNA, sendo que a maioria das bactérias possui cinco a dez. Isto pode facilitar os estudos sobre o controle de mecanismos de síntese do rRNA. Existem várias razões para focalizar atenção nestes genes, como a obtenção de produtos altamente conservados, que servem como marcadores filogenéticos e facilitam a seleção e clonagem de sondas para detecção e identificação dos mollicutes (RAZIN, 1985).

A divisão celular, replicação do DNA e sistemas de reparos é menos complexa, quando comparada a outras bactérias com genomas maiores. Nos micoplasmas, como em muitas espécies, a divisão celular e replicação não

são coordenadas (RODWELL et al., 1972). Os mollicutes parecem apresentar uma única DNA polimerase, em contraste às três DNA polimerases encontradas na *E. coli* e outros procariotos. Ainda não está claro, mas houve uma perda da atividade de exonuclease da DNA polimerase, o que pode proporcionar um marcador bioquímico indicativo de divergências entre os mollicutes e eubactérias (MANILOFF, 1983).

Os mollicutes, por possuírem os menores genomas, estão entre os primeiros microrganismos selecionados em projetos de seqüenciamento total do genoma. Atualmente, têm-se sequencias completas do genoma de *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. gallisepticum*, *M. mobile*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. hyopneumoniae*, *M. synoviae*, *M. agalactiae*, *M. arthritidis* e outros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os dados obtidos, de seqüências genômicas dos mollicutes, têm proporcionado a exploração do conteúdo funcional desse genoma e a relação evolutiva entre eles, em novo nível qualitativo. A análise desses genomas confirmou a redução de genes de vias bioquímicas e está auxiliando na definição de genes essenciais para a auto-replicação de uma célula (RAZIN, 2006). Para o *M. genitalium*, já foram descritos 517 genes, sendo 265-350 essenciais para sua sobrevivência em condições laboratoriais (FRASER et al., 1995)

A análise genômica do *M. genitalium* e *M. pneumoniae* tem revelado a escassez de genes envolvidos nas vias biossintéticas, resultado do processo de evolução degenerativa, que ocasionou perda de todos os genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e de cofatores (vitaminas), que devem ser suplementados aos meios de cultivo *in vitro* (RAZIN et al., 1998). A economia de informação genética resultou na perda da parede celular e na dependência de suplementos lipídicos das células hospedeiras (RAZIN, 2006). A deficiência da via biossintética de ácidos graxos foi compensada pela incorporação de grandes quantidades de colesterol exógeno em sua membrana, que possui ação tamponante, além de necessário na manutenção da fluidez da membrana (RAZIN, 1978).

A membrana plasmática dos mollicutes está exposta ao ambiente, em contato com os constituintes do sistema imune do hospedeiro. A perda da proteção da parede celular dessas bactérias resultou na sensibilidade à inibição de crescimento

e lise por anticorpos e complementos. Muitos micoplasmas patogênicos possuem sofisticados mecanismos para uma rápida adaptação a mudanças microambientais. Os micoplasmas alteram a expressão e modificam antígenos protéicos de superfície de membrana, proporcionando um escape efetivo diante da rápida destruição pelo sistema imune do hospedeiro. Esta variação antigênica e conseqüente seleção constante de subpopulação resultam no caráter crônico das infecções por mollicutes (RAZIN, 2006).

Entre os *Mollicutes*, o espiroplasma e acholeplasma são mais freqüentemente infectados por uma variedade de fagos, sendo conhecidos poucos vírus que infectam espécies do gênero *Mycoplasma* (ZOU et al., 1995; VOELKER e DYBVIG, 1998). O genoma dos fagos apresenta 4 a 40 kpb, podendo ser circular ou linear, e de fita simples ou dupla. Dos poucos fagos que infectam os micoplasmas, o mais recente descoberto é o fago lisogênico MAV1, que infecta o *M. arthritidis*. Este fago foi isolado em amostras altamente artritogênicas e provavelmente está relacionado à patogenicidade (VOELKER e DYBVIG, 1999).

Dois plasmídeos foram isolados em diferentes linhagens de *M. mycoides* subsp. *Mycoides*, abrindo a possibilidade do desenvolvimento de estudos de genes em micoplasma (KING e DYBVIG, 1992). Os plasmídeos isolados, pertencentes à família de plasmídeos das Gram-positivas, se replicam a partir de DNA intermediário de fita simples (KING e DYBVIG, 1994). Também já foi descrito isolamento de plasmídeo para o gênero *Spiroplasma*, espécie de *Spiroplasma citris*. A ocorrência de plasmídeos em fitoplasma sugere relação com patogenicidade, entretanto, ainda não foram comprovados (NISHIGAWA, 2002).

2.4.4 Características gerais dos mollicutes

Os mollicutes se diferenciam de outras bactérias principalmente pelo seu pequeno tamanho, ausência de parede celular (RAZIN, 1995). Apesar de ausente a parede celular, sua forma geralmente é ovóide. Os micoplasmas, em geral, aproximam-se das dimensões dos maiores vírus (0,2 a 0,4 μm). Poucas espécies, entretanto, apresentam-se espiraladas, atingindo cerca de 100 μm . A forma filamentosa é "multinucleada" e pode ocorrer em determinados momentos da multiplicação, pela falta de sincronia entre a septação durante a divisão celular e

replicação do DNA. Assim, além da fissão binária, a partir dos filamentos, formam-se cadeias ou conjuntos de pequenos micoplasmas viáveis que se desprendem, e sob pressão em filtros, podem transpor a porosidade de 0,22 μm (BASEMAN e TULLY, 1997).

O crescimento destes microrganismos, em meio sólido, é expresso em pequenas colônias de 50 – 500 μm de diâmetro, usualmente em forma de “ovo frito”, visualizadas através de microscópio estereoscópio. O crescimento, em meio líquido, geralmente não causa turvação, resultando somente alteração no pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (RAZIN, 1995).

Apesar de não possuírem flagelos, algumas espécies exibem deslizamento sobre plástico ou vidro ou apresentam contração celular, como o *M. amphoriforme*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. alvi*, *M. sualvi* e *M. móbile* (RAZIN, 2006).

Alguns micoplasmas possuem estrutura ou prolongamento polar em sua superfície denominada “blebs”, com alta concentração de moléculas de adesão, que permitem a esses microrganismos ligarem-se à célula hospedeira (RAZIN, 2002). Acredita-se que estas estruturas, em algumas espécies, estejam envolvidas na penetração em células hospedeiras, processo este descoberto no micoplasma de origem humana, o *M. penetrans* (LO et al., 1992).

Basicamente, os *Mollicutes* são divididos em dois grupos: fermentadores e não-fermentadores. Os fermentadores produzem ácidos por meio da metabolização da glicose e de outros carboidratos, diminuindo o pH do meio de cultivo, e os não-fermentadores, possuem a via da arginina-deidrolase na obtenção de ATP, aumentando o pH (RAZIN, 1978).

Alguns micoplasmas são capazes de utilizar ambas as vias, e os ácidos produzidos na glicólise podem mascarar a alcalinização do meio de cultura causada pela hidrólise da arginina (OLSON et al., 1993). Outros micoplasmas não metabolizam açúcares e arginina, mas são capazes de oxidar ácidos orgânicos (lactato e piruvato) a acetato e CO_2 (MILES et al., 1994). Os ureaplasmas requerem uréia para produzir ATP, hidrolizando este composto e produzindo amônia (BASEMAN e TULLY, 1997; RAZIN, 2004).

Muitas espécies de micoplasmas expressam de forma variável, na superfície celular, antígenos estruturalmente heterogêneos. Modificações nos genes que codificam moléculas de adesão revelam distintos modos de mutação, capazes de

gerar mudanças no tamanho e diversidades antigênicas nas moléculas de superfície. Estas alterações são indicativas de um importante mecanismo na patogenicidade das infecções por micoplasmas, por mimetizar e escapar da resposta imune, alterando sua colonização e penetração nos tecidos (NICOLSON et al., 1999).

O contato entre os micoplasmas e as células hospedeiras pode resultar na fusão de membranas, troca dos componentes de membrana e até, inoculação do conteúdo citoplasmático dos micoplasmas, incluindo enzimas hidrolíticas. Assim, as potentes nucleases dos *Mollicutes*, combinadas aos radicais superóxidos, podem ser responsáveis por efeitos clastogênicos nas células, ou seja, quebra dos cromossomos, que podem resultar no ganho, na perda, ou em rearranjos genéticos (RAZIN et al. 1998).

2.4.5 Nutrição

A definição de requerimentos orgânicos (aminoácidos, precursores de ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos, vitaminas e outros) para o crescimento de bactérias está relacionada a diferentes vias metabólicas para cada gênero ou espécie. Os requerimentos inorgânicos dos mollicutes têm sido objeto de poucos estudos e os resultados são freqüentemente difíceis de interpretar. Os elementos presentes nas células bacterianas e que podem ser acrescentados aos meios são: P (4,2%), Mg^{2+} (0,6%), K (1,2%) e Fe^{2+} (0,02%). Outros elementos, principalmente metais, podem ser necessários em pequenas quantidades (MILES, 1992).

A temperatura de aproximadamente 37 °C é indicativa do “habitat” natural dos mollicutes, que corresponde às dos mamíferos e pássaros. *Spiroplasmas*, que infectam plantas, têm temperatura ótima de crescimento entre 30 a 32 °C e os *Anaeroplasmas* podem crescer até a 49 °C (GARDELLA e DEL GIUDICE, 1983).

O crescimento e sobrevivência dos mollicutes são dependentes do pH. Para espécies originárias de plantas e vertebrados, o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0. Os ureplasmas são exceções, sendo o pH ótimo de 5,5 a 6,0 e seu crescimento inibido em pH acima de 7,5 (RAZIN, 1978). A inibição do crescimento destas bactérias, em meios de cultura, pode ocorrer pela

excessiva produção de ácidos ou álcalis gerados pelo metabolismo do próprio microrganismo.

A pressão osmótica durante o crescimento de algumas espécies de *Mycoplasma* spp. e o *Acholeplasma laidlawii*, em meio líquido ou sólido, encontra-se próxima a 10 atm, com variações entre os diferentes gêneros e espécies, podendo atingir pressões de 6,5 a 32 atm. A variabilidade dos requerimentos osmóticos no crescimento de algumas espécies é significativa para a pesquisa, incluindo o isolamento e estudos nutricionais (RAZIN, 1978).

Devido à perda de vias enzimáticas - presente em outras bactérias - e às vias ineficientes de produção de energia, algumas espécies utilizam a via glicolítica e produzem ácidos a partir de carboidratos. Outros mollicutes utilizam a via de hidrólise da arginina, que resulta na produção de ornitina, ATP, CO₂ e amônia, ou ainda o catabolismo da uréia (RAZIN, 1995; RAZIN, 2004).

As colônias (50-500 µm) de mollicutes, em meio sólido, podem ser visualizadas com auxílio de microscópio estereoscópico e, os limites da microscopia óptica dificultam o estudo destes microrganismos, devido a sua dimensão de aproximadamente 0,3 µm de diâmetro e 98 µm de extensão. Frequentemente, os mollicutes apresentam pleomorfismo, podendo ser cocoidal e filamentoso (CARSON et al., 1992). Em muitas espécies, há evidências de formação de filamentos, especialmente durante a fase exponencial inicial. Rodwell et al. (1972) concluíram que crescimentos filamentosos ocorrem em quase todos mollicutes sob condições adequadas, e o aumento no tempo da cultura pode favorecer a mudança na forma. A morfologia também pode ser alterada pela qualidade nutricional, variação osmótica do meio e pelo conteúdo de lipídio da membrana (MILES, 1992).

A complexidade dos requerimentos nutricionais, a variação na forma celular e a fragilidade osmótica fazem com que os mollicutes estejam sob constantes investigações quanto a sua fisiologia, para relatar seu crescimento e ecologia. As condições sob as quais eles se multiplicam podem influenciar na estrutura e funcionamento das células hospedeiras, sendo importantes não somente para os fisiologistas, como também para todos micoplasmologistas envolvidos em estudos quantitativos (RAZIN, 1978).

2.4.6 Habitat

Os mollicutes estão amplamente distribuídos na natureza como parasitas de humanos, mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. A detecção de novos hospedeiros para essas bactérias tem aumentado continuamente a lista de espécies de mollicutes (RAZIN, 2006). Aproximadamente, 200 espécies são conhecidas, mas somente um número reduzido, principalmente do gênero *Mycoplasma*, é considerado patógeno de animais (FREY, 2002).

Os micoplasmas geralmente são espécies específicas com afinidade por tecidos pré-determinados, provavelmente refletindo a sua natureza nutricional e forma de vida como parasita obrigatório. Entretanto, existem muitos exemplos de micoplasmas presentes em hospedeiros e tecidos diferentes do habitat de origem (TULLY, 1996).

Estes agentes estão associados a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem variar de agudo a, mais freqüentemente, crônicos (JASPER, 1967; TULLY, 1993; SAHU e YEDLOUTSCHNIG, 1994). O habitat primário dos micoplasmas, em humanos e animais, são as superfícies das mucosas do sistema respiratório, urogenital, conjuntival e gastrointestinal bem como, glândulas mamárias e líquido sinovial (RAZIN, 2006).

2.4.7 *Mycoplasma* em suínos

Os principais micoplasmas de interesse na suinocultura são *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae* (ARMSTRONG, 1994). O *M. flocculare*, apesar de isolado freqüentemente em cavidade nasal de suínos saudáveis ou com pneumonia, é considerado apenas um microrganismo apatogênico. Entretanto, há grande interesse nesta espécie devido a sua similaridade com o *M. hyopneumoniae* (FRIIS, 1972, 1974; KOBISCH e FRIIS, 1996).

Outros mollicutes já foram isolados de suínos, como *M. arginini*, *M. bovis genitalium*, *M. buccale*, *M. hyopharyngis*, *M. gallinarum*, *M. iners*, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. salivarium*, *M. suis*, *Acholeplasma* (A.) *axanthum*, *A. granularum*, *A. laidlawii* e *A. oculi*. Entretanto, a patogenicidade dessas espécies é questionável (ARMSTRONG, 1994).

2.4.7.1 *M. hyosynoviae*

O *M. hyosynoviae* apresenta distribuição mundial e está presente na maioria das granjas onde a produção de suínos é intensiva (KOBISCH e FRIIS, 1996). O primeiro isolamento no Brasil ocorreu em 2003, proveniente de articulação com processo inflamatório de suíno (ALBERTON et al., 2003).

Este agente é responsável pela poliartrite em suínos velhos, enfermidade esporádica caracterizada por baixa morbidade (ARMSTRONG, 1994). Nos suínos em fase de crescimento, a artrite ocorre na forma de surtos (ROSS e DUCAN, 1970; ROSS, 1971), acometendo freqüentemente animais entre 40 a 100 kg, resultando em perdas econômicas, devido à diminuição da taxa de crescimento, perda de peso, custo no tratamento com antibióticos e condenação de carcaças (KOKOTOVIC et al., 2002; ALBERTON et al., 2003).

As matrizes podem permanecer como portadoras do *M. hyosynoviae*, mas dificilmente os leitões desenvolvem sinais clínicos antes de quatro semanas de idade, devido à presença de anticorpos maternos. Na fase aguda, os animais apresentam grande quantidade deste patógeno em secreção nasal, o que proporciona a propagação da infecção pelo rebanho. O sinal clínico mais evidente é o aparecimento súbito de claudicação, em um ou mais membros, porém o aumento de volume na articulação comprometida pode passar despercebido (SOBESTIANSKY et al., 1999). A fase aguda da doença pode persistir por 3 a 10 dias e em muitos casos é auto-limitante, sem evidências de claudicação crônica nos animais. Na necropsia de articulações comprometidas encontra-se grande quantidade de fluído, que varia de sero-sanguinolento a sero-fibrinoso, e inflamação das membranas sinoviais (ROSS, 1993).

2.4.7.2 *M. hyorhinis*

O *M. hyorhinis* foi primeiramente isolado do trato respiratório superior de suínos jovens e tem sido classificado como agente causal em pleurites, peritonites, artrites e otite média em suínos, enfermidades caracterizadas por inflamação serofibrinosa de membranas serosas e articulares. Este agente ocorre freqüentemente em granjas suinícolas e geralmente está associado a quadros

agudos ou crônicos de poliserosite e artrites, em suínos de 3 a 10 semanas e, ocasionalmente, em adultos SPF (Specific Pathogen Free). O *M. hyorhinis* é freqüentemente isolado de cavidades nasais e tonsilas, podendo causar poliserosites, retardo no crescimento e redução da eficiência alimentar (FRIIS e FEENSTRA, 1994).

Apesar do *M. hyorhinis* ter sido associado à PES por Dinter et al. (1965) e alguns autores (STOLA e SCHUMAN, 1966; GOIS et al., 1967; FRIIS, 1971) o confirmarem como agente causal da pneumonia, durante muitas décadas ele foi considerado apenas patógeno secundário da PES (GOODWIN et al., 1967; SWITZER, 1967; PIFFER, 1983; DONE, 1997), ou parte da microbiota residente do trato respiratório superior de suínos (WHITTLESTONE, 1979; MATTSSON et al., 1995; MORITA et al., 1999).

No Japão, em 1996, KOBAYASHI et al. (1996) associaram o *M. hyorhinis* a doenças reprodutivas e síndromes respiratórias e, no mesmo ano, foi relatado na China o primeiro isolamento de *M. hyorhinis* em pulmões com lesões compatíveis de pneumonia, sendo confirmada a presença de anticorpos por meio de Western Blotting. Entretanto, a vacinação em granjas não tem sido utilizada no controle da disseminação deste agente e a quimioterapia é usada objetivando a diminuição da incidência de doenças associadas a *M. hyorhinis* (WU et al., 2000).

Previamente, todas as incidências da PES foram reconhecidas como resultado das infecções primárias por *M. hyopneumoniae*. Entretanto, estudos recentes vêm comprovando a patogenicidade do *M. hyorhinis* como agente primário, sozinho ou em associação com *M. hyopneumoniae*. Meyling (1971), examinando casos de pneumonia micoplasmática em suínos, pela Imunofluorescência Direta (ID), observou que pulmões negativos para *M. hyopneumoniae* apresentavam *M. hyorhinis*, localizado sobre o epitélio bronquial, como nas pneumonias causadas por *M. hyopneumoniae*. Apesar dessas observações, o *M. hyorhinis* ainda é considerado um típico patógeno secundário da PES ou “meramente” presente em lesões pneumônicas (LIN et al., 2006).

Apesar *M. hyorhinis* ser pouco estudado como agente etiológico nas doenças suínas, ele está entre as espécies mais freqüentemente detectadas como contaminantes em cultivo celular (KAZAMA et al., 1994; TIMENETSKY et al., 2006), causando prejuízos consideráveis aos laboratórios de pesquisa, bem como às indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, que utilizam sistemas celulares na

produção de insumos biológicos (UPHOFF e DREXLER, 2002).

Os micoplasmas, em sua grande maioria, aderem-se à membrana citoplasmática quando infectam culturas celulares. McGarrity e Kotani (1985), por meio da microscopia eletrônica, observaram que o *M. hyorhinitis* permanecia aderidos praticamente na totalidade da superfície celular. Este agente, entre outros micoplasmas, possui a capacidade de alterar seus antígenos de superfície através de mecanismos como variação de fase e de tamanho e mascaramento de epítomos de proteínas de superfície (RAZIN et al., 1998). A intensa capacidade de variação antigênica dos micoplasmas permite, quando patógenos, escaparem da resposta imune dos hospedeiros. De fato, foi verificada a presença do gene VLps para *M. hyorhinitis*, que controla sistemas responsáveis pela diversidade antigênica (ROSENGARTEN et al., 1993).

O *M. hyorhinitis* foi relatado entre as espécies que interferem na replicação de alguns vírus (McGARRITY e KOTANI, 1985). Lipp et al. (1979) relataram inibição da atividade transcriptase reversa e na replicação do retrovírus pela atividade metabólica do *M. hyorhinitis*. No cultivo celular, a replicação viral depende de fatores inerentes como: partícula viral, tipo de célula hospedeira e sua integridade.

A infecção da cultura celular por micoplasma pode resultar na sobrevida das células, e quando utilizada no cultivo viral pode determinar a multiplicação deficiente desses agentes (TIMENETSKY, 2004).

O interesse pelo *M. hyorhinitis* na medicina vem crescendo desde o seu isolamento em humanos. Huang et al. (2001) relataram que, em 90 pacientes com câncer de estômago, 50 (56%) foram positivos para *M. hyorhinitis*. Em outras doenças gástricas, a infecção por micoplasma foi de 28% (18/49) em gastrite superficial crônica, 30% (14/46) em úlcera gástrica e 37% (18/49) em metaplasia intestinal. A frequência das infecções por micoplasmas em câncer de esôfago, pulmão, mama e glioma foram de 50,9% (27/53), 52,6% (31/59), 39,7% (25/63) e 41% (38/91), respectivamente. Em vários países, foi constatada uma correlação alta entre as infecções por micoplasma e diferentes cânceres, o que sugere a possibilidade de associação entre eles. O mecanismo envolvido na oncogênese por micoplasma ainda é desconhecido (HUANG et al., 2001).

2.4.7.3 *M. hyopneumoniae*

O *M. hyopneumoniae* é considerado o agente primário da PES, doença responsável pela alta morbidade e baixa mortalidade em suínos, com período de incubação de 10 a 21 dias. A PES é considerada uma doença multifatorial e sua gravidade e importância econômica na granja está associada à variações climáticas, sistema de produção utilizado e ao manejo (KOBISCH et al., 2000; SCHWARTZ, 2001).

A forma clínica da doença é mais comum em animais de crescimento e terminação. Entretanto, em rebanhos sem imunidade, a doença pode afetar leitões a partir de duas semanas de idade, bem como animais em fase de reprodução (STÄRK, 2000; RIBEIRO et al., 2004).

O *M. hyopneumoniae* pode ser transmitido de forma direta através do contato com secreções do trato respiratório de suínos infectados, e indireta, através de aerossóis (PIFFER, 1983; SHELDRAKE et al., 1990; SOBESTIANSKY et al., 1994). Segundo Ross (1986), as matrizes de primeira cria se infectam e permanecem portadoras por mais tempo do que as adultas e, devido à baixa imunidade, eliminam mais microrganismos quando comparadas às matrizes com maior número de gestações. A transmissão intrauterina ou através do leite não foi observada (PRIKAZSKY, 1988).

Os sinais clínicos associados à PES são tosse crônica e seca, dispnéia, atraso no crescimento e baixa conversão alimentar (ARMSTRONG, 1994; VICCA et al., 2003; YAMAGUTI, 2008). Quando a infecção é introduzida na granja, o período de latência pode variar de quatro a seis semanas e, em alguns casos, dois a três anos. Nas granjas onde a doença é endêmica, o período de latência é variável e os sinais clínicos, principalmente tosse seca, pode não ocorrer (SOBESTIANSKY et al., 1994).

O suíno parece ser o único hospedeiro do *M. hyopneumoniae*, o qual coloniza o trato respiratório, causando danos aos cílios e ao epitélio da cavidade respiratória (SOBESTIANSKY et al., 2001). A porta de entrada do agente é a via respiratória superior, ocorrendo adesão do microrganismo à superfície de células ciliares da traquéia, brônquios e bronquíolos, devido a expressão da proteína P97 (adenosina), que reconhece receptores glicolipídicos sulfatados presentes nos cílios. Em decorrência desta adesão, ocorre a redução da atividade ciliar, perda gradual dos

cílios, formação de microcolônias com proliferação para outras células sadias e, finalmente, destruição do epitélio, com comprometimento do sistema mucociliar (ZHANG et al., 1994; KOBISCH, 1997; MINION et al., 2000).

Além da adesão/colonização e interação com o sistema imune, outros aspectos da patogenia da PES vêm sendo identificados. A lipoproteína P65 (*M. hyopneumoniae*) é especificamente reconhecida durante a infecção e, Schmidt et al. (2004) ao identificá-la, sugeriram sua participação na função nutricional do microrganismo, como responsável pela aquisição de ácidos graxos e por promover a redução de surfactantes pulmonares, favorecendo a atelectasia dos alvéolos.

Devido ao impacto econômico causado pela PES, existe um grande empenho na comunidade científica em estudar o *M. hyopneumoniae*. Atualmente, encontra-se disponível no GenBank o genoma completo da cepa J e dos isolados 7448 (Brasil) e 232 (EUA).

2.4.7.4 Diagnóstico

Apesar do cultivo e isolamento de micoplasma ser considerado o padrão ouro no diagnóstico das micoplasmoses, este teste apresenta limitações como: tempo prolongado de crescimento *in vitro*, presença de bactérias indesejáveis no material biológico, meio de cultivo diferenciado e profissional especializado (RAZIN, 2002; YAMAGUTI, 2003; OLIVEIRA, 2008). Entretanto, o isolamento do agente proporciona a identificação da espécie infectante, com a possibilidade de estudos epidemiológicos e profiláticos da enfermidade (OLIVEIRA, 2003).

Na rotina laboratorial das doenças respiratórias em suínos, os principais métodos de diagnóstico estão direcionados para a detecção do *M. hyopneumoniae*.

Devido às características singulares da PES, o diagnóstico sugestivo pode ser realizado pela associação dos sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. Entretanto, à subjetividade e imprecisão deste diagnóstico exige exames complementares para a sua confirmação (PIFFER 1983; MAES 1996; RIBEIRO et al., 2004)

O emprego da Imunofluorescência Direta (IFD) pode ser utilizado na rotina laboratorial (PIFFER, 1983). Nos casos agudos da doença, onde existe grande

grande número de células de *M. hyopneumoniae*, este teste é mais sensível. Porém, nas infecções crônicas a sensibilidade diminui devido ao baixo número de microrganismos (FEESNTRA et al., 1994).

Vários testes sorológicos foram desenvolvidos para detecção de anticorpos de *M. hyopneumoniae*, como: Hemaglutinação Indireta (HI), Fixação de Complemento, Imunofluorescência Indireta e Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA). Estes testes são utilizados para a avaliação da granja, dinâmica da infecção e a prevalência da doença, sendo considerado diagnóstico de rebanho. Entretanto, reações cruzadas com *M. hyorhinis* e *M. flocculare* já foram relatadas (ARMSTRONG et al., 1978; MAES et al., 1996). O ELISA, com anticorpo monoclonal, para a detecção da proteína 74kDa do *M. hyopneumoniae* é mais sensível do que a HI e, não apresenta reação cruzada com outros micoplasmas (FELD et al., 1992).

Com os avanços da biologia molecular, métodos baseados na aplicação de tecnologia do DNA recombinante como hibridação de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo utilizados para a detecção do *M. hyopneumoniae* (STEMKE, 1989; AHRENS e FRIIS, 1991; ABIVEN et al., 1992; FUTO et al., 1992). Vários trabalhos descrevem a utilização da PCR no diagnóstico do *Mycoplasma* spp em amostras biológicas como suabe nasal, lavado traqueal e tecido pulmonar. Estes trabalhos demonstraram alta sensibilidade e especificidade da técnica, tornando a identificação do agente mais rápida e precisa (MATTSSON et al., 1995; BACCARO et al., 1999; VERDIN et al., 2000). Blanchard et al. (1992) utilizaram a PCR para a detecção de *M. hyopneumoniae*, em amostra de lavado traqueal de suínos inoculados experimentalmente, e detectaram sensibilidade de 4×10^2 microrganismos. Tang et al. (1997) aumentaram a sensibilidade da técnica com o emprego da Nested-PCR (N-PCR), devido ao duplo processo de amplificação, que melhora a identificação do agente. Verdin et al. (2000) e Yamaguti et al. (2008) utilizaram a N-PCR e encontraram sensibilidade de um fentograma (equivalente a um microrganismo) e 80 fentogramas, respectivamente, mostrando a eficiência desta técnica.

Outra técnica empregada no diagnóstico de micoplasma de suínos é a PCR-Multiplex, que utiliza primers para diferentes espécies de bactérias, identificando-as com um único ciclo de amplificação. Stankeborg et al. (2006) e Lin et al. (2006), ao utilizarem essa técnica, comprovaram sua eficiência e rapidez para identificar numa

mesma reação o *M. hyopenumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*.

A importância do desenvolvimento de métodos moleculares para o diagnóstico rápido, sensível e específico da infecção por micoplasma é essencial para a prevenção e controle de doenças.

2.4.7.5 Tipificação

Estudos de epidemiologia molecular têm contribuído de forma significativa para a elucidação da relação entre cepas clínicas e ambientais, demonstrando a clonalidade, biodiversidade, rotas de propagação, variações geográficas, e estabelecimento de padrões e métodos preventivos baseados na microbiologia preditiva e análise de risco (BURCHRIESER et al., 2003; ROCOURT et al., 2003; GASANOV et al., 2005). Epidemiologicamente os microrganismos, envolvidos em surtos de doenças infecciosas, possuem uma origem comum e são clones muito semelhantes, isto é, membros da mesma espécie que apresentam fatores de virulência, características bioquímicas e genômicas análogos (OLIVE e BEAN, 1999).

Todos os métodos de tipificação podem ser caracterizados segundo a tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e de interpretação, com diferentes custos (TAMBIC et al., 1999; TENOVER et al., 1997; WANG et al., 2002). As metodologias devem apresentar alto poder de diferenciação e possuir habilidade em reproduzir resultados testados repetidamente com a mesma amostra (ARBEIT, 1995).

Na medicina veterinária, as técnicas PFGE, AFLP e seqüenciamento são as mais freqüentemente utilizadas na tipificação de isolados de micoplasma provenientes de suínos.

A PFGE é considerada padrão ouro entre os métodos de tipagem molecular (OLIVE e BEAN, 1999). Desenvolvida inicialmente por Schwartz e Cantor (1984), como um instrumento para investigação de DNA cromossômico de células eucariontes, e posteriormente, descrita como um eficiente método para tipagem de muitas cepas bacterianas (TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997). Esta metodologia sofreu alterações como a utilização de campos elétricos transversais aplicados a um gel vertical (GARDINER et al., 1986), inversão periódica em campo

elétrico único (CARLE, 1989) e campo elétrico gerado por múltiplos eletrodos dispostos em módulo quadrado ou hexagonal ao redor do gel horizontal (TOLA et al., 1996). O princípio básico da PFGE é a clivagem da molécula íntegra de DNA por endonucleases de restrição, que reconhecem sítios de raros no cromossomo alvo. Esta técnica pode ser aplicada para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo considerada altamente discriminatória e reprodutível para cepas endêmicas e epidêmicas (MORETTI-BRANCHINI et al., 1993; TENOVER et al., 1995). Devido à diversidade e estabilidade de perfis de DNA genômico, a técnica de PFGE tem sido muito precisa na tipagem epidemiológica de isolados (ALFIZAH et al., 2002).

A AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) tem por base a amplificação seletiva de fragmentos de DNA gerados pela digestão enzimática (MCLAUCHLIN et al., 2000; VOS et al., 1995). O perfil de fragmento gerado é mais complexo quando comparada a outras metodologias, aumentando o poder discriminatório entre as amostras analisadas. A estratégia no uso de duas enzimas e amplificação seletiva proporciona uma extraordinária flexibilidade no protocolo de tipagem para um dado agente microbiano. Estudos têm demonstrado que a AFLP é reprodutível e diferenciação de amostras derivadas do mesmo clone (JANSSEN et al., 1996; KOELEMAN et al., 1998).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares de seqüenciamento genético vêm promovendo um grande avanço na obtenção de dados relacionados aos patógenos, no que se refere à compreensão de sua biologia, fatores de virulência, evolução, diferenças fenotípicas e, conseqüentemente, às ações de diagnóstico e prevenção. (VASQUEZ-BOLAND et al., 2001; BUCHRIESER et al., 2001).

A discriminação entre microrganismos semelhantes pode também serem analisadas pelas seqüências nucleotídicas de genes evolutivamente conservados, permitindo detectar diferenças entre clones. O seqüenciamento de uma porção do DNA vem sendo aplicado, por exemplo, na epidemiologia molecular de doenças bacterianas. Para esse efeito, utiliza-se a reação da PCR para amplificar os genes que se destinam ao seqüenciamento. As seqüências alvo incluem genes para proteínas de superfície, resistência a antibióticos e, mais freqüentemente, o 16S rRNA. Por vezes, o seqüenciamento é usado em conjunto com outros métodos de tipagem, como a PFGE, permitindo examinar a transferência horizontal de genes entre clones da mesma espécie. A amplificação pela PCR e seqüenciamento direto dos fragmentos amplificados, sem necessidade de clonagem, é indicada para

microrganismos em cultura pura e abundante. O seqüenciamento, embora dispendioso, é útil na identificação e discriminação de microrganismos de difícil cultivo ou em culturas mistas (JOHASSON e PETTERSSON, 2002; ALVES et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- isolamento, identificação e tipificação genotípica de *Mycoplasma* spp. de material biológico do sistema respiratório de suínos com problemas respiratórios.

3.2 Específicos:

- cultivo e isolamento de *Mycoplasma* spp., em meio FM, de muco nasal/tonsilar, fragmentos de pulmão/traquéia/tonsila de suínos com problemas respiratórios;
- identificação dos isolados de micoplasma pela PCR-Multiplex para as espécies *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, obtidos de material biológico do sistema respiratório de suínos;
- avaliação de diferenças genotípicas, pela PFGE, entre isolados de *M. hyorhinis* e cepa de referência *M. hyorhinis* ATCC 17891;
- avaliação das diferenças genotípicas intraespecífica e intespecífica por meio do seqüenciamento do gene 16S rRNA das cepas de referência *M. hyopneumoniae* ATCC 25934, *M. hyorhinis* ATCC 17891 e *M. flocculare* ATCC 27716 e isolados, obtidos de material biológico do sistema respiratório de suínos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de referência

Foram utilizadas as cepas de referência de *M. hyopneumoniae* cepa J (ATCC 25934), *M. hyorhinis* (ATCC 17981) e *M. flocculare* (ATCC 27716).

4.2 Meios de cultura

No isolamento de micoplasmas, provenientes do material biológico de suínos, e nos subcultivos das cepas de referências e isolados foi utilizado o meio FRIIS (FRIIS, 1971) modificado (FM), líquido e sólido (Anexo A). Este meio foi modificado pela adição de lactoalbumina, glicose, extrato de levedura fresco, bacitracina e metecilina e pela retirada do acetato de tálio, penicilina, polimixina B e cicloserina. O meio FM acrescido de 1% ágar foi utilizado na avaliação das características morfológicas de colônias e o líquido, no transporte das amostras clínicas.

4.3 Amostras clínicas

Foram coletadas amostras clínicas de muco nasal e tonsilar de suíno, provenientes da região de São Paulo e Norte do Paraná, em quatro propriedades de engorda. Os pulmões dos suínos foram obtidos em dois frigoríficos da cidade de São Paulo. As amostras foram coletadas no período de setembro de 2005 a novembro de 2007.

As coletas de muco nasal e tonsilar foram realizadas em 63 suínos, com idades entre 8 a 16 semanas e sinais clínicos de tosse e espirro. Os animais foram contidos com corda, para obtenção do material nasal, e abridor de boca, para o tonsilar. Os suabes foram friccionados na parede da cavidade nasal e tonsilar, sendo suas extremidades cortadas e acondicionadas em tubos de rosca contendo 3 mL de meio líquido FM. Os tubos foram transportados, sob refrigeração, ao laboratório para análise, em um período inferior a 10 horas.

No frigorífico, foram coletados fragmentos de 02 traquéias, 02 tonsilas e de 78 pulmões de suínos, dentre estes, coletou-se em 02 animais, a traquéia, a tonsila e o pulmão. Os pulmões com lesões macroscópicas compatíveis com pneumonia foram selecionados durante a inspeção, na mesa de evisceração, para obtenção de um único fragmento com aproximadamente 10 cm³. Os fragmentos de traquéia e tonsila foram provenientes de 02 animais com lesões macroscópicas em todos os lobos pulmonares. Os materiais biológicos (traquéia/tonsila/pulmão) foram acondicionados em sacos plásticos e transportados, em gelo, imediatamente ao laboratório.

4.4 Cultivo de *Mycoplasma* spp. de amostras clínicas

O meio líquido FM com o material clínico foi homogeneizado e 1 mL desta suspensão foi filtrado em membrana de porosidade 0,45 µm, obtendo-se aproximadamente 600 µl. Deste filtrado, 200 µl foram inoculados em 1,8 mL de meio FM, homogeneizados e realizadas três diluições decimais, de cada amostra.

As amostras de traquéia, tonsila e pulmão foram cortadas com tesoura estéril obtendo-se fragmentos de 2 cm³, em seguida, macerados em graal com 2 mL de meio FM e centrifugados a 3000 xg por 10 minutos, sob refrigeração. O sobrenadante foi filtrado em membrana com porosidade 0,45 µm, obtendo-se entre 400 a 600 µl. Do filtrado, 200 µl foram inoculados em tubos contendo 1,8 mL de meio FM, homogeneizados e realizadas três diluições decimais para cultivo (OLIVEIRA, 2008).

Os tubos, contendo o filtrado e o meio FM (2,0 mL), foram incubados em microaerofilia a 37 °C, em agitador rotacional, e observados diariamente por 30 dias. Após a observação de mudança de cor no meio de cultura, devido à presença do indicador de pH, as amostras foram semeadas em meio sólido. A presença de micoplasmas foi caracterizada inicialmente pela produção de colônias típicas (forma de “ovo frito”) ou atípicas, formação de filmes e manchas e por suas bases metabólicas, evidenciado pela alteração de pH (RAZIN e TULLY, 1983).

Dos filtrados, provenientes do muco (nasal/ tonsilar) e fragmento de pulmão e traquéia, aproximadamente 300 µl foram aliquotados e congelados a -20 °C, para contraprova.

A partir dos isolamentos obtidos em meio sólido, foi realizada clonagem, semeando uma única colônia em meio líquido e novamente em sólido. Este procedimento foi repetido três vezes para cada colônia selecionada, de cada isolado.

4.5 PCR-Multiplex

As culturas dos isolados, obtidos das amostras clínicas, e das cepas de referência foram submetidas à extração do DNA, destinado a amplificações, por meio da PCR-Multiplex, para identificação de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*.

4.5.1 Extração de DNA

Culturas (1 mL) das cepas de referência e dos isolados foram submetidas à extração de DNA por sílica como descrito por Boom et al. (1990), com modificações (Anexo B). O DNA extraído (30 µl) foi acondicionado em microtubo (500 µl) e estocado a -20 °C até sua utilização.

4.5.2 PCR-Multiplex para identificação de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*

Os “primers forward” MHYOP, MHYOR e MFLOC (Quadro 1) são complementares à sequência conservada do gene 16S rRNA do *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, respectivamente, como descrito por Stakenborg (2005). Para a escolha do “primer reverse” foi realizado o alinhamento das sequências, depositadas no Genbank, de *M. hyopneumonia* (EO2783), *M. hyorhinis* (M24658) e *M. flocculare* (X63377), utilizando-se o programa CLC FREE WORKBENCH 5. para a escolha de uma sequência conservada nas três espécies. O “primer” desenvolvido foi denominado MYrev (Quadro 1).

Quadro 1 - “Primers” da PCR-Multiplex, com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho dos produtos amplificados, esperados para cada espécie. MHYOP: *M. hyopneumoniae*; MHYOR: *M. hyorhinis*; MFLOC: *M. flocculare*; MYrev: reverse, For: forward.

“Primer”	Seqüência	Produto
MHYOP For	5'- TTC AAA GGA GCC TTC AAG CTT C -3'	728 pb
MHYOR For	5'- CGG ATG TAG CAA TAC ATTC AG -3'	856 pb
MFLOC For	5'- GGG AAG AAA AAA TTA GGT AGG G -3'	482 pb
MYrev	5'- GGG TTC CCG TCA ATT CCT TTA -3'	-

A reação foi desenvolvida para um volume final de 30 µl. Foram adicionados a um microtubo: 3,6 µl de tampão (10x concentrado) da reação [10 mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 50 mM de KCl], 20 pmol de cada “primer”, 1 mM de MgCl₂, 2 µl com 0,2 mM de cada nucleotídeo e 1 unidade (U) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Na amplificação foi realizado um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 54,6 °C (hibridização dos “primers”) e 60 segundos a 68 °C, além de um ciclo final de 10 minutos a 72 °C. A mistura dos reagentes e a adição de 2 µl de DNA extraído foram realizadas em salas separadas.

4.5.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos da PCR (10 µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10 µg/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). A visualização dos produtos foi realizada sob luz ultravioleta (UV) e, na fotodocumentação, utilizou-se o aparelho Vilbert Lourmart®. O marcador de peso molecular utilizado foi 200 pb DNA Ladder (Omega®). Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR-Multiplex.

4.6 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A extração do DNA (molécula íntegra) e a digestão com enzimas de restrição foram baseadas nos procedimentos descritos por OLIVEIRA (2008), com

modificações na extração, digestão e eletroforese. Para a padronização da PFGE foram utilizadas as cepas de referência descritas no item 4.1. As culturas destas cepas, previamente estocadas a -70°C , foram descongeladas e 200 μL de cada espécie, subcultivada em 1,8 mL de meio líquido, incubado a 37°C . Após crescimento, os 2 mL da cultura foram transferidos para 10 mL de meio FM líquido.

4.6.1 Obtenção do sedimento de micoplasma

Para a obtenção do sedimento das células de micoplasma foram testadas centrifugações com 14000, 12000, 10000 e 4000 $\times g$ / 20 minutos. Na lavagem do sedimento foram utilizados os tampões descritos por Stakenborg (2005) e Oliveira (2008).

Para a sedimentação das células de micoplasma das culturas (12 mL) foi definida a centrifugação com 4000 $\times g$ por 20 minutos e o sedimento lavado duas vezes com 2 mL de PBS, pH 7,20 (OLIVEIRA, 2008), seguido de centrifugação com 7000 $\times g$ / 20 minutos e ressuspenso em 110 μL de Tris-EDTA (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). A suspensão dos micoplasmas (110 μL) foi homogeneizada, na proporção de 1:1, em 2% de agarose ultra pura (UltraPure DNA Grade Agarose - Bio-Rad®) e distribuídas em suporte plástico (Bio-Rad®). Foram utilizados 12 mL de cultura, para cada cepa de referência, na obtenção de 02 blocos de agarose.

4.6.2 Extração do DNA

A extração foi realizada como descrito por Oliveira (2008). Os blocos, contendo micoplasmas, foram transferidos para 2,5 mL de Triton-EDTA (1% de Triton-X 114, 0,5 M EDTA; pH 8,0) e incubados a 38°C por duas horas. Em seguida, acrescentou-se 2,5 mL de EDTA (0,5 M) à solução com os blocos (totalizando 5,0 mL), que foram incubados a 48°C por 24 horas.

Na digestão protéica, os blocos foram transferidos para um tubo de rosca contendo 2,0 mL de solução EDTA (0,5 M), 1% de sarcosine e 1 mg/mL de

proteínase K (Sigma®). Os blocos foram incubados a 55 °C por 20 horas e posteriormente submetidos a cinco lavagens, com 10 mL de tampão TE (20 mM Tris Base, 50 mM EDTA, pH:8,0) em agitação por 20 minutos a 4 °C, e estocados em 0,2% de TBE (45 mM Tris Base, 45 mM Ácido bórico, 1,0 mM EDTA, pH 8,30) a 4 °C.

4.6.3 Digestão enzimática

A digestão enzimática do DNA das cepas de referência, contidos nos blocos, foi realizada pelas enzimas de restrição: *AvaI*, *BamHI*, *NaeI*, *PstI*, *SaI*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI* (BioLabs®). Cada ½ bloco foi depositado em 150 µl de água ultra pura, 15 µl do tampão de enzima e 30 U de cada enzima, incubados a 37 °C por 18 horas. Para as enzimas *BamHI*, *PstI*, *SaI*, *XbaI* e *XhoI* foi acrescido na reação 1,5 µl de BSA (1mg/mL).

4.6.4 Padronização dos programas de eletroforese para PFGE

Foram testados diferentes pulsos elétricos e tempos de eletroforese para a melhor visualização da separação dos fragmentos de DNA (cepas de referência) e peso molecular Low Range PFG Maker (BioLabs®). A voltagem e o ângulo utilizados foram de 6 volts/cm e 120°, respectivamente. Os programas testados na PFGE para os produtos obtidos pela digestão do DNA, das cepas de referência, com as enzimas *AvaI*, *BamHI*, *NaeI*, *PstI*, *SaI*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI* foram:

- Programa I:

1º estágio: pulsos elétricos de 01 a 04 s e tempo de eletroforese de 08 hs;

2º estágio: pulsos elétricos de 04 a 40 s e tempo de eletroforese de 10 hs.

- Programa II:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 13 s e tempo de eletroforese de 12 hs;

2º estágio: pulsos elétricos de 13 a 20 s e tempo de eletroforese de 02 hs.

- Programa III:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 05 s e tempo de eletroforese de 12 hs;

2º estágio: pulsos elétricos de 07 a 13 s e tempo de eletroforese de 02 hs.

- Programa IV:

1º estágio: pulsos elétricos de 01 a 07 s e tempo de eletroforese de 07 hs;

2º estágio: pulsos elétricos de 07 a 20 s e tempo de eletroforese de 09 hs.

- Programa V:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 13 s e tempo de eletroforese de 18 hs.

- Programa VI:

1º estágio: pulsos elétricos de 01 a 13 s e tempo de eletroforese de 16 hs;

As eletroforeses foram realizadas em gel com 1,2% de agarose ultra pura (UltraPure DNA Grade Agarose - Bio-Rad®), 0,2% de Tampão TBE (45 mM Tris base, 45 mM Ácido bórico, 1,0 mM EDTA, pH 8,30) a 13,5 °C, em aparelho de PFGE (CHEF Mapper Dr-III, Bio-Rad®). Foram realizadas eletroforeses com adição de 130 ng/mL de thiourea (Sigma®) no gel e no tampão de corrida.

4.6.5 PFGE da cepa e isolados clínicos de *M. hyorhinis*

Foram realizadas eletroforeses dos produtos obtidos pela digestão do DNA da cepa e isolados de *M. hyorhinis*. Os produtos digeridos pela *AvaI*, *BamHI*, *NaeI*, *PstI*, *SaI*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI* foram separados em aparelho de PFGE (CHEF Mapper Dr-III, Bio-Rad®). O peso molecular padrão Low Range PFG Marker (0,1 a 200 Kpb, BioLabs®) foi utilizado em todas as eletroforeses. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,1 µg/mL) por 60 minutos, lavado em água destilada (agitação) por 40 minutos e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Na fotodocumentação do gel foi utilizado o aparelho Vilbert Loumart®.

4.6.6 Análise da PFGE

Os fragmentos polimórficos foram analisados pelo programa BioNumeric®. O dendrograma foi produzido de acordo com o “Weight Pair-Group Mean Arithmetic Method” (UPGMA), baseado no coeficiente DICE com 1% de otimização.

4.7 Seqüenciamento dos nucleotídeos

O volume de 2 mL de culturas das cepas de referência e dos isolado foram utilizados para extração do DNA (Anexo B).

4.7.1 Otimização da PCR com “primers” F16S e R16S e seqüenciamento do gene 16S rRNA

A seqüência do gene 16S rRNA dos microorganismos foi amplificada pela PCR por meio dos “primers” universais F16S e R16S (Quadro 2), descrito por Harasawa e Cassel (1996).

Quadro 2 - “Primers” F16S/R16S utilizados na reação da PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto esperado

“Primers”	Seqüência	Produto
F16S	5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA GG-3'	~1400
R16S	5'- GGG ATA CCT TGT TAC GAC TT-3'	

Para a PCR, foram adicionados a um microtubo (0,2 mL) 10 pmol de cada “primer”, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Platinum-Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5 µl da amostra de DNA e água ultra pura até volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e 4°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR (10 µl) e o marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). Na visualização de apenas um fragmento de 1400 pb, sob luz UV, o produto amplificado foi purificado utilizando o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham®) e quantificado em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) contendo 10 µg/mL de brometo de etídeo. A visualização dos produtos foi realizada sob luz UV.

As amostras amplificadas foram enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP/SP, Setor de Seqüenciamento de DNA. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando Base Caller Cimarron 3.12.

4.7.2 Desenvolvimento dos “primers” RCO3/RCO4 e seqüenciamento

Foram utilizados os seqüenciamentos dos isolados e cepas de referência de micoplasmas, obtidos pelos “primers” F16S/R16S, no desenvolvimento dos “primers” RCO3/RCO4 (Quadro. 3), referentes à região interna do gene 16S rRNA. As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa CLC FREE WORKBENCH 5. para alinhamento e verificação de regiões-alvo. Foram escolhidas duas seqüências conservadas para espécies de micoplasma, entre os isolados e as cepas de referência seqüenciadas, submetidas ao programa GENE RUNNER para análise e sua posterior síntese.

Quadro 3- “Primers” RCO3/RCO4 utilizados na reação da PCR e seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto esperado e localização no gene 16S rRNA

“Primers”	Seqüência	Produto	Localização
RCO3	5'- GGA GGC AGC AGT AGG GAA T - 3'	~700 pb	335 – 354
RCO4	5'- CCA ACA TCT CAC GAC ACG A - 3'		1052 –1071

4.7.2.1 Padronização da PCR com “primers” RCO3/ RCO4

Para a reação em cadeia da polimerase, foram adicionados a um microtubo (0,2 mL) 10 pmol de cada “primer”, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Platinum-Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5 µl da amostra de DNA e água ultra pura até volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos,

72 °C por 1 minuto, um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e 4 °C por 10 minutos. O produto foi visualizado, purificado e seqüenciado como descrito nos itens 4.7.1.

4.7.3 Análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA

Os seqüenciamentos, dos produtos amplificados, com os “primers” F16S/R16S, RCO3/RCO4, foram analisados pelo programa CLC FREE WORKBENCH 5. para a formação da fita única de nucleotídeos do gene 16S rRNA, dos isolados e das cepas de referência. As seqüências primárias de nucleotídeos obtidas, juntamente com as cepas depositas no GenBank (Tabela 1), foram submetidas ao Progama Bionumeric® para análise e formação do dendrograma, de acordo com o “Weight Pair-Group Mean Arithmetic Method” (UPGMA).

Tabela 1 - Espécies de micoplasma do GenBank e seus respectivos números de identificação, utilizadas no alinhamento do gene 16S rRNA para a formação do dendrograma.

Espécie	Nº no GenBank
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> cepa J	AE017243
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 7448	AE017244
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 232	NC006360
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> cepa 29052	AF121890
<i>Mycoplasma flocculare</i> Ms42	X62699

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento

No primo cultivo das amostras clínicas, o tempo para mudança na cor do meio líquido (indicativo de crescimento), resultante da alteração do pH (alcalinização ou acidificação), variou de 3 a 20 dias de incubação. No meio sólido, foi necessário um período de incubação de 2 a 40 dias para visualização de colônias características de micoplasmas. Na avaliação das colônias, foi observada a presença de morfologias atípicas, com ausência de núcleo (Fig. 1 A, B, C) e típicas de “ovo frito” (Fig. 1 D, E, F) e.

No procedimento destinado à clonagem dos isolados, o tempo de crescimento em meio líquido e sólido foi inferior ao primo cultivo. Todos os isolados clonados apresentaram acidificação em meio líquido/sólido e, formação de filmes e manchas não foi visualizada em meio sólido. As colônias obtidas no subcultivo apresentaram morfologias semelhantes às observadas no primo cultivo. As características bioquímicas e morfológicas dos isolados clonados não determinaram a espécie dos micoplasmas.

Das 126 amostras, de muco nasal (63 animais) e tonsilar (63 animais), foram obtidos 40 (31,74%) isolados de *Mycoplasma* spp., sendo 20 (50,00%) de cada sítio anatômico. Dentre os animais amostrados, 10 (15,87%) suínos apresentaram isolamentos simultâneos em sítio anatômico nasal/tonsilar, resultando no total de 20 isolados.

Dos fragmentos de pulmão (78 amostras), traquéia (2 amostras) e tonsila (2 amostras) foram obtidos 19 (23,17%) isolados, sendo 17 (89,47%) de pulmão, 1 de traquéia e 1 de tonsila. Dentre os isolados obtidos de fragmentos de órgãos de suínos abatidos, 1 animal apresentou isolamento simultâneo de pulmão, de traquéia e de tonsila (Tabela. 2).

Figura 1 - Colônias de *Mycoplasma* spp. (aumento de 10X em microscópio estereoscópico, objetiva 40), com e sem “núcleo”, isoladas de material biológico de suínos em meio sólido FM. A, B, C: colônias atípicas (sem núcleo); D, E, F: colônias típicas (com núcleo).

Tabela 2 - Frequência de isolamento de *Mycoplasma* spp., obtidos em meio sólido FM, segundo sítio anatômico de coleta e número de animais, provenientes da região de São Paulo e Capital e norte do Paraná, no período de 2005 a 2007.

Material biológico	Isolamento			
	Animais		Isolados	
	Nº	%	Nº	%
Suabe nasal	10	21,28	10	16,95
Suabe tonsilar	10	21,28	10	16,95
Suabe nasal e tonsilar	10	21,28	20	33,90
Frag. de pulmão	16	34,04	16	27,12
Frag. de traquéia	00	0,00	00	0,00
Frag. de tonsila	00	0,00	00	0,00
Frag. de pulmão, traquéia e tonsila	01	2,12	03	5,08
Total	47	100,00	59	100,00

5.2 PCR-Multiplex

A utilização dos “primers forward”, descrito por Stakenborg (2005) e o “primer reverse”, denominado MYrev, foi eficiente na amplificação dos diferentes fragmentos de 856, 728 e 482 pb correspondentes ao *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* utilizados na identificação dos isolados de micoplasmas (Fig. 2).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR-Multiplex (subunidade 16S rRNA) utilizando “primers” MHYOP, MYOR, MFLOC, MYrev, a partir do DNA extraído dos isolados. Coluna 1 a 13: amostras positivas para *M. hyorhinis*. Coluna 14: controle positivo *M. flocculare*. Coluna 15: controle positivo *M. hyorhinis*. Coluna 16: controle positivo *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. Coluna 17: controle negativo das reações com água ultra-pura. PM: padrão de peso molecular de DNA – 200 bp.

Dos 59 isolados de *Mycoplasma* spp., 56 (94,91%) foram identificados como *M. hyorhinis*, 02 (3,39%) como *M. flocculare* e 01 (1,70%) como *M. hyopneumoniae* (Tabela 3).

Entre os 20 isolados, obtidos de muco nasal, foram identificados como *M. hyorhinis* 19 (90%) e como *M. flocculare* 01 (10%) e os mesmos resultados foram obtidos entre os 20 isolados tonsilares. Dos 20 isolados, obtidos dos 10 suínos que apresentaram isolamentos simultâneos em sítios anatômicos nasal/tonsilar, todos foram identificados como *M. hyorhinis* (Tabela 3).

Dos 19 isolados obtidos de fragmentos de órgãos, 18 (90,%) foram identificados como *M. hyorhinis* (16 de pulmão, 01 de traquéia, 01 de tonsila) e 01(10%) isolado de pulmão identificado como *M. hyopneumoniae*. Destes 19 isolados, 03 foram provenientes do mesmo animal (tonsila, traquéia e pulmão) e identificados como *M. hyorhinis*.

Tabela 3 – Frequência de isolados identificados pela PCR-Multiplex (*M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*), segundo material biológico do sítio anatômico de suínos provenientes da região de São Paulo e Capital e norte do Paraná, no período de 2005 a 2007.

Material Biológico	PCR-Multiplex							
	<i>M. hyorhinis</i>		<i>M. hyopneumoniae</i>		<i>M. flocculare</i>		Total	
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Muco nasal	19	33,93	-		01	50,00	20	33,90
Muco tonsilar	19	33,93	-		01	50,00	20	33,90
Frag. de pulmão	16	28,58	01	100,00	-		17	28,82
Frag. de traquéia	01	1,78	-		-		01	1,69
Frag. de tonsila	01	1,78	-		-		01	1,69
Total	56	100,00	01	100,00	02	100,00	59	100,00

5.3 Padronização da PFGE

Para a definição dos parâmetros da PFGE foram testados: condição de sedimentação (rotação e tempo de centrifugação), lavagens das células bacterianas, tampões de lavagem, enzimas de restrição e programas de separação dos fragmentos digeridos e do peso molecular.

O protocolo descrito por Oliveira (2008) foi modificado para 12 mL de cultura (obtenção de DNA de micoplasmas), tempo de centrifugação de 20 minutos com 4000 *xg* para a sedimentação e 20 minutos com 7000 *xg* para a lavagem. No tampão do gel e da eletroforese foi adicionado 130 ng/mL de thiourea.

O tampão PBS (pH 7,2) utilizado na lavagem dos sedimentos de micoplasma apresentou melhor resultado quando comparado ao tampão glicosado (STAKENBORG, 2005) (Figura 3).

Figura 3 - PFGE (Programa IV, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído do subcultivo da cepa de referência *M. flocculare* (ATCC 27716), digerido pela enzima *Ava*I e eletroforese com Thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: sedimento celular lavado com tampão glicosado. Coluna 2: sedimento celular lavado tampão PBS. PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).

5.3.1 Digestão enzimática

Na digestão enzimática, do DNA das cepas de referência de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* e de um isolado de *M. hyorhinis*, com as enzimas de restrição *AvaI*, *BamH*, *XbaI* e *XhoI*, foi visualizado melhor perfil de fragmentos com a enzima *AvaI* (Figura 4). Para o *M. hyopneumoniae* foi obtido perfil de fragmentos com as enzimas *AvaI*, *BamH* e *XbaI*. Com a cepa e isolado de *M. hyorhinis* as enzimas *AvaI* e *XbaI* resultaram em perfil de restrição.

Figura 4 - PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído do subcultivo das cepas de referência e isolado de *M. hyorhinis*, digerido pelas enzimas *AvaI*, *BamH*, *XbaI*, *XhoI*. Colunas 1 a 4: DNA da cepa de referência (*M. hyopneumoniae*) com *AvaI*, *BamH*, *XbaI*, *XhoI*, respectivamente; Colunas 5 a 8: DNA da cepa de referência (*M. hyorhinis*) com *AvaI*, *BamH*, *XbaI*, *XhoI*, respectivamente; Colunas 9 a 12: isolado de *M. hyorhinis* com *AvaI*, *BamH*, *XbaI*, *XhoI*, respectivamente, PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).

O perfil de fragmentos do DNA da cepa e isolados de *M. hyorhinis*, clivado pelas enzimas *XhoI*, *PstI*, *AvaI* e *NaeI*, está apresentado na Figura 5. A digestão

enzimática com as enzimas *XhoI* e *AvaI* resultou em número de fragmentos adequado para análise de variação genotípica.

Figura 5 - PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e isolado de *M. hyorhinis* digerido pelas enzimas *XhoI*, *PstI*, *AvaI* e *NaeI*. Colunas 1, 3 e 5: DNA da cepa de referência com *XhoI*, *PstI*, *AvaI* respectivamente; Colunas 2, 4, 6 e 7: DNA do isolado com *XhoI*, *AvaI*, *PstI*, e *NaeI*, respectivamente, PM: Marcador Low Range PFG (0,13 a 194 Kpb).

A enzima *SmaI* utilizada na digestão dos DNAs das cepas de referências de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* e dos isolados de *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, gerou perfil de fragmentos. Para a cepa de referência de *M. hyopneumoniae*, foram obtidos 10 fragmentos, porém com a cepa de referência de *M. hyorhinis* e isolado de *M. hyorhinis* e *M. flocculare* o número de fragmentos gerados foi de 2 a 3 (Figura 6).

Figura 6 - PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído do subcultivo das cepas de referência de *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* e isolados de *M. hyorhinis* e *M. flocculare*, digerido pela enzima *Sma*I. Colunas 1, 2 e 4: cepas de *M. hyopneumoniae*; Colunas 3 e 7: cepas *M. hyorhinis*; Coluna 5: Isolado de *M. hyorhinis*; Coluna 6: isolado de *M. flocculare* PM: Marcador Low Range PFG Marker (0,13 a 194 Kpb).

5.3.2 Padronização dos programas de eletroforese

Diferentes pulsos e tempos de eletroforese foram testados para a escolha do programa que resultasse na visualização de fragmentos nítidos do DNA da cepa de referência e do peso molecular. No Quadro 4 estão relacionados os programas aos resultados da eletroforese, apresentados nas Figuras 7 e 8. Iniciou-se a padronização dos pulsos, objetivando maior distanciamento entre os fragmentos de DNA, das cepas e isolados de micoplasmas, no intervalo entre 9,42 a 194,0 Kpb, referentes ao peso molecular. Foram utilizadas as cepas de referência *M.*

hyopneumoniae (ATCC 25934), *M. hyorhinis* (ATCC 17981), *M. flocculare* (ATCC 27716) e isolados de *M. hyorhinis*, para eletroforeses com os diferentes programas.

Os programas II, III e IV, compostos por dois estágios, resultaram na separação do marcador molecular, porém não permitiram a separação dos fragmentos, da cepa e isolados de *M. hyorhinis*, no intervalo entre 23,1 a 145, 5 Kpb, obtidos pela enzima *AvaI* (Figura 7B, C e D). Nos programas V e VI, composto por um estágio, os fragmentos da cepa e isolados de *M. hyorhinis*, foram separados adequadamente. Não foi visualizada diferença entre estes programas e a escolha do VI foi devido ao menor tempo de eletroforese (Fig. 7E e F).

Quadro 4 - Programas de eletroforese compostos por um ou dois estágios, com diferentes pulsos e tempo de corrida, utilizados na padronização da PFGE.

Programa	1º estágio		2º estágio	
	Pulsos (segundos)	Eletroforese (horas)	Pulsos (segundos)	Eletroforese (horas)
I (Figura 7A)	1,0 a 4,0	8	4,0 a 40,0	10
II (Figura 7B)	0,5 a 13,0	10	7,0 a 20,0	04
III (Figura 7C)	0,5 a 5,0	16	7,0 a 13,0	02
IV (Figura 7D)	1,0 a 7,0	07	7,0 a 20,0	09
V (Figura 7E)	0,5 a 13,0	18	-	-
VI (Figura 8F)	1,0 a 13,0	16	-	-

Figura 7: PFGE com diferentes programas de eletroforese, com um ou dois estágios, testados na padronização da separação dos fragmentos de DNA, da cepa de referência e isolados de *M. hyorhinis*, digerido pela enzima *Ava*I. A: Programa I; B: Programa II; C: Programa III; D: Programa IV; E: Programa V; F: Programa VI.

5.3.3 PFGE da cepa de referência e isolados de *M. hyorhinis*

Na PFGE das cepas e isolados de *M. hyorhinis* foram utilizados os parâmetros: 12 mL de subcultivo com sedimentação celular em centrifugação 4000 x g/20 minutos; lavagem do sedimento com PBS (pH 7,20) em centrifugação a 7000 x g/20 minutos; digestão protéica por 24 horas (proteinase K: 1mg/mL); tampão para lavagem dos blocos descrito no manual do aparelho de PFGE; digestão enzimática com *Ava*I (30U) e *Xho*I (30U); adição de thiourea (130mg/mL) no gel de agarose (1,2%) e no tampão de corrida; eletroforese com o Programa VI.

Dos 56 isolados identificados como *M. hyorhinis*, 16 não apresentaram crescimento nos subcultivos. Dos 40 isolados subcultivados em 12 mL, somente 26 (65,0%) apresentaram perfil de fragmentos após digestão com a enzima *Ava*I. Foi obtido perfil na PFGE de 09 isolados de fragmentos de pulmão, 01 fragmento de tonsila, 01 fragmento de traquéia, 08 de muco nasal, 07 de muco tonsilar e da cepa de referência (Figura 8).

Figura 8 - PFGE (Programa VI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e dos isolados de *M. hyorhinis*, digerido pela enzima *Ava*I e eletroforese com Thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 5: DNA de isolados de fragmentos de pulmão; Coluna 6: DNA de isolado de fragmento de tonsila; coluna 7: DNA de isolado de fragmento de traquéia; Colunas 8 e 9: DNA de isolados de muco nasal; Coluna 10: DNA da cepa de referência de *M. hyorhinis* (ATCC 17981); PM: Low Range PFG Marker (0,13 a 242.5 Kpb).

Entre os 40 isolados subcultivados em 12 mL, somente 23 (57,50%) apresentaram perfil de fragmentos após digestão com a enzima *Xho*I. Foi obtido perfil na PFGE de 06 isolados de fragmentos de pulmão, 01 fragmento de tonsila, 01 fragmento de traquéia, 08 de muco nasal, 07 de muco tonsilar e da cepa de referência (Figura 9).

Figura 9 - PFGE (Programa VI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,2%) do DNA extraído de subcultivos da cepa de referência e isolados de *M. hyorhinis*, digerido pela enzima *Xho*I e eletroforese com thiourea (130ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 6: DNA de isolados de fragmento de pulmão; Colunas 7 a 9: DNA de isolados de muco nasal; Coluna 10: DNA da cepa de *M. hyorhinis* (ATCC 17981); PM: Low Range PFG Marker (0.13 a 194 Kpb)

5.3.4 Análise da PFGE da cepa e isolados de *M. hyorhinis* obtidos com a enzima *Ava*I

O dendrograma obtido pelo coeficiente DICE (otimização 1%), a partir do perfil enzimático da *Ava*I, utilizando o ponto de corte $\geq 70\%$ para similaridade (STRUELENS et al., 2001), permitiu agrupar os isolados de *M. hyorhinis* em 11 “clusters” que variaram de similaridade entre 70 a 100% (Figura 10). Não houve formação de clusters segundo sítio anatômico (fragmento de pulmão, tonsila ou traquéia, muco nasal ou tonsilar) dos isolados, bem como segundo suas origens (frigorífico ou propriedade para engorda), como observado no cluster “f” (Figura 10).

Os isolados “083 Pulmão”, “083 Traquéia” e “083 Tonsila” foram obtidos do mesmo animal, porém apresentaram perfis diferentes e foram agrupados nos clusters “h” (traquéia) e “j” (pulmão e tonsila). A cepa de referência (origem nasal) não localizada no cluster “i”, não formou um grupamento somente com isolados do mesmo sítio anatômico.

Figura 10 - Dendrograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA da cepa de referência e isolados de *M. hyorhinis*, digerido pela enzima Aval. F: frigorífico, P: propriedade. Seta: ponto de corte “Cluster”.

5.3.5 Análise da PFGE da cepa e isolados de *M. hyorhinis* com a enzima *Xho*I

O dendrograma obtido pelo coeficiente DICE (otimização 1%), a partir do perfil enzimático da *Xho*I, utilizando ponto de corte $\geq 70\%$ para similaridade (STRUELENS et al., 2001), permitiu agrupar os isolados de *M. hyorhinis* em nove “clusters” que variaram de similaridade entre 70 a 100% (Figura 11). Assim como no dendrograma obtido com a digestão pela *Ava*I (Figura 10), não foi observada a formação dos clusters de acordo com o sítio anatômico (fragmento de pulmão, tonsila ou traquéia, muco nasal ou tonsilar) dos isolados, bem como suas origens (frigorífico ou propriedade para engorda). Os isolados “083 Traquéia”, “083 Tonsila” e “083 Pulmão”, obtidos do mesmo animal, apresentaram perfis diferentes e foram agrupados nos cluster “a”, “e”, “g”, respectivamente. A cepa de referência foi agrupada com isolados obtidos de diferentes sítios anatômicos, semelhantemente ao observado na PFGE com a enzima *Ava*I.

Figura 11: Dendrograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA da cepa e isolados de *M. hyorhinis*, digeridos pela enzima *Xho*. F: frigorífico, P: propriedade. Seta: ponto de corte "Cluster".

5.4 Seqüenciamento

5.4.1 PCR com “primers” F16S/R16S

Os DNAs das cepas de referência e dos 06 isolados (Tabela 4) submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S confirmou a presença de apenas um fragmento, de aproximadamente 1500 pb (Figura 12), na eletroforese (agarose 1,5%). Os produtos amplificados foram purificados e quantificados (Figura 10) em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

Tabela 4 – Cepas de referência (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) e isolados de *M. hyorhinis* submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S para a amplificação e seqüenciamento completo do gene 16S rRNA.

Coluna (Figura 10)	Isolado	Sítio anatômico	Propriedade
1	9 <i>M. hyorhinis</i>	Tonsila	P1
2	12 <i>M. hyorhinis</i>	Nasal	P1
3	14 <i>M. hyopneumoniae</i>	Pulmão	F1
4	20 <i>M. flocculare</i>	Nasal	P1
5	35 <i>M. hyorhinis</i>	Pulmão	F1
6	83 <i>M. hyorhinis</i>	Tonsila	P2
7	<i>M. hyopneumoniae</i>	PES*	-
8	<i>M. hyorhinis</i>	Cavidade nasal	-
9	<i>M. flocculare</i>	PCS*	-

* Isolado de um caso: (PES) Pneumonia Enzoótica Suína e (PCS) Pneumonia Catarral Suína

Figura 12 – A: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” universais F16S/R16S, das cepas de referência (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) e isolados de *M. hyorhinis*. Colunas 1 a 6: DNA dos isolados de *M. hyorhinis*; Colunas 7 a 9: DNA das cepas de referências; Coluna 10: controle negativo da reação com água ultra pura; PM: peso molecular de DNA – 100 bp. B: Eletroforese em gel de agarose dos produtos purificados, obtidos na PCR com os “primers” F16S/R16S, das cepas de referências (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) e isolados de *M. hyorhinis* (colunas 1 a 9); ML: Mass ladder.

O seqüenciamento dos produtos amplificados pelo F16S (Figura 13) e R16S (Figura 14), das cepas de referências e dos isolados de micoplasma (Tabela 4) foram alinhados (Programa CLC FREE WORKBENCH 5.) e analisados, separadamente. O produto de aproximadamente 1500 pb obtidos não apresentou leitura de aproximadamente 500 bases, referente à região interna do gene 16S rRNA. Regiões conservadas presentes no gene 16S rRNA das espécies do gênero *Mycoplasma*, parcialmente obtido no seqüenciamento, foram escolhidas e submetidas ao programa GENE RUNNER para análise e definição dos “primers” RCO3/RCO4, como esquematizado na Figura 15. As localizações dos “primers” RCO3 e RCO4, no gene 16S rRNA, são as posições 335 pb 5'→3' e. 1041 pb 3'→5', respectivamente (Figura 16), obtidas através do seqüenciamento do *M. hyorhinis* disponível no GenBank (Nº GenBank EU714234).

Figura 13 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos, das cepas de referências e isolados de micoplasma, obtidas pelo seqüenciamento com o “primer” F16S. No quadro em destaque, região homóloga nas espécies de micoplasmas analisadas, escolhida para o “primer” RCO3.

Figura 14 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos, das cepas de referências e isolados de micoplasma, obtidos pelo seqüenciamento com o “primer” R16S. No quadro em destaque, região homóloga nas espécies de micoplasmas analisadas, escolhida para o “primer” RCO4.

Figura 15 - Representação da localização dos “primers” RCO3/RCO4 na região interna do gene 16S rRNA, seqüenciado pelos “primers” F16S/R16S, para obtenção de aproximadamente 1500 pb deste gene.

GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTCGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTTGAACGGGATGTAGCAATACATTCAGTAGCGAATGGGTGAGTAACACGTACCTAACCTACCTTTAAGACTGGGATAACTATTGGAAACAATAGCTAATACCCGGATATAGTTATTTATCGCATGATGAGTAATAGAAAGGAGCTTCACAGCTTCACCTAAAAATGGGGGTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTTTAGCCGGGCCGAGAGGCTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGTTCTTCGGAATGTAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAATAGAA TAGGAAATGATTTTATCTTGCGGTCCCTTATTAGAAAAGCGACGGCAAACATATGTGCCAGCAGCCCGCGGTAATACA TAGGTCGCAGCGTTATTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCTAGGTTTTTGTCTAAAGTCTGGAGTTAAATGCT GAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTTGGATACTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGC GGTGGGAATGCGTAGATATTAGGAAGGACACCAATAGGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATATATTGACACTAAGG GACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGGCCACGCCGTAAACGATGATCATTAATTGGTGG AGTAATTCACTAACCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGA ATTGACGGGAACCCGACCGAGCGGTGGAACATGTGGTCTAATTTGAAGATCGCGAAGACCTTACCCACTCTTGAC ATCTTCTGCAAAAGCTATAGAGATATAGTGAGGTTACAGAATGCAGATGGTGCATGGTTGTGCGCAGCTCGTGTCTGT AGATGTTAGGTTAAGTCCTGCAACGAGGCAACCCCTTTTCTTTAGTTACTAATATTAAGTTAAGGCTCTAGAGATA CTGCCTGGGTAACCAGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAACACACGTGC TACAATGGTTCGTACAAAGAGAAGCAATATGGTGACATGGAGCAATCTCAAAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGA AGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTC GGGTTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCATGGGAGTTGGTAATGCCCAAAGTCGGTGAGTTAACTTCGGAGACCA TTGCCTAAGGCAGGACTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC

Figura 16 - Localização dos “primers” F16S e R16S (preto) e RCO3 posição 335 pb 5’→3’ e RCO4 posição 1041 pb 3’→5’ (cinza) na sequência completa do gene 16S rRNA do *M. hyorhinis* (GenBank nº EU714234)

5.4.2 Padronização da PCR com “primers” RCO3/RCO4

Os DNAs, das cepas de referência e isolados de micoplasmas (Tabela 04), submetidos à PCR com “primers” RCO3/RCO4, resultaram na presença de um fragmento de aproximadamente 700 pb (Figura 17), visualizados na eletroforese (agarose 1,5%).

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” RCO3/RCO4, a partir do DNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas. Colunas 1 a 4: isolados de micoplasmas; Colunas 5 a 7: cepas de referência; Coluna 8: controle negativo da reação com água ultra pura; Coluna 9: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.4.3 Seqüenciamento do gene 16S rRNA

O seqüenciamento do gene 16S rRNA foi realizado com as cepas de referências (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*) e 21 isolados de micoplasmas. Entre os 21 isolados, identificados na PCR-Multiplex, 07 foram provenientes de fragmento de pulmão (01 de *M. hyopneumoniae* e 06 de *M. hyorhinis*); 01 de fragmento de traquéia (*M. hyorhinis*); 01 fragmento de tonsila (*M. hyorhinis*); 04 de muco nasal (01 de *M. flocculare* e 03 de *M. hyorhinis*); 08 de muco tonsilar (01 de *M. flocculare* e 07 de *M. hyorhinis*).

5.4.4 Alinhamento das regiões amplificadas

O seqüenciamento realizado com os “primers” F16S, R16S, RCO3 e RCO4 foram alinhados (Programa CLC FREE WORKBENCH 5.) para a formação de uma

única fita do gene 16S rRNA das cepas de referências e dos isolados, descritos no item 5.4.3 (Anexo C).

5.4.5 Análise do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA

O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, obtidos com os “primers” RCO3/RCO4, das cepas e isolados de micoplasmas e as seqüências de micoplasmas depositadas no GenBank, foram agrupados por meio de análise com algoritmo UPGMA para a construção do dendrograma. O ponto de corte $\geq 97\%$ para similaridade intraespecífica (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994; KESWANI e WHITMAN, 2001; RAZIN e HERRMANN, 2002), resultou na formação de três braços identificados como A, B e C, referentes às espécies de *M. flocculare* (A), *M. hyopneumoniae* (B) e *M. hyorhinis* (C) (Figura 18).

Os isolados, obtidos de diferentes sítios anatômicos e identificados como *M. hyorhinis* pela PCR-Multiplex, foram agrupado em no braço C. Os isolados e as cepas de referências de *M. hyorhinis* apresentaram similaridade próxima a 98% e não foram agrupadas de acordo com o sítio anatômico de origem. Foi observada similaridade de 100% entre isolados, e entre isolados e cepa de referência do *M. hyorhinis*.

Figura 18 – Dendrograma das relações genéticas entre as seqüências parciais do gene 16S rRNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas obtidos pela PCR com “primers” RCO3/RCO4 e seqüências disponíveis no GenBank. Seta: ponto de corte $\geq 97\%$.

5.4.6 Análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA

Foi obtida leitura de 1438 bases no seqüenciamento dos produtos amplificados com os “primers” F16S/R16S e RCO3/RCO4. Na análise da seqüência do gene 16S rRNA da cepa ATCC 17981 e de 16 isolados de *M. hyorhinis* foram detectadas variações em 31 posições (TABELA 5). Os 16 isolados apresentaram 04 a 11 posições polimórficas, quando comparados à sequência do gene 16S rRNA da ATCC 17981. Entre as posições 1416 a 1438 está localizado o maior número de polimorfismos encontrados entre a cepa de referência ATCC 17981 e os 13 isolados.

Entretanto, nas posições 1416, 1417, 1419, 1420 e 1438 encontram-se bases comuns somente entre os isolados. Foram observadas inserções apenas nas posições 747, 1336 e 1434 (Tabela 5). As diferenças encontradas entre as referências ATCC 17981, seqüenciada neste trabalho, e a 29052 (disponível no GenBank) de *M. hyorhinis* foram de 10 posições polimórficas.

O gene 16S rRNA da cepa ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*, seqüenciado neste trabalho, não apresentou polimorfismo, mas 04 deleções quando comparado à seqüência da cepa J, disponível no GenBank. No isolado “014 Pulmão” foi detectado 27 polimorfismos, 01 deleção e 01 inserção, quando comparado a cepa ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*. O “014 Pulmão” quando analisados com as seqüências dos isolados 232 (EUA) e 7448 (Brasil), disponíveis no GenBank, resultou em 26 e 27 posições polimórficas, respectivamente (Tabela 6).

Foram encontrados 05 e 07 polimorfismos no gene 16S rRNA dos isolados “009 Tonsila” e “020 Nasal”, respectivamente, quando comparado à cepa de referência ATCC 27716, seqüenciada neste trabalho. Quando estes isolados foram comparados ao gene 16S rRNA do isolado Ms42, disponível no GenBank, observou-se entre 05 a 06 polimorfismos (Tabela 7).

No dendrograma (UPGMA) do seqüenciamento completo do gene 16S rRNA das cepas de referência (*M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*) e dos isolados de micoplamas, utilizando ponto de corte $\geq 97\%$ para similaridade (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994; KESWANI e WHITMAN, 2001; RAZIN e HERRMANN, 2002), observou-se os grupamentos A, B e C referentes às espécies *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis*, respectivamente. No grupamento C, os isolados de *M. hyorhinis*, cepa de referência ATCC 17981 e cepa EU 714234 (disponível no GenBank) apresentaram similaridade superior a 98%. A cepa ATCC 17981 e os isolados, seqüenciados neste trabalho, apresentaram similaridade superior a 99%.

Figura 19 – Dendrograma das relações genéticas entre as seqüências dos genes 16S rRNA das cepas de referência e isolados de micoplasmas obtidos pela PCR com “primers” F16S/R16S e RCO3/RCO4 e seqüências disponíveis no GenBank. Seta: ponto de corte $\geq 97\%$.

TABELA 5 – Polimorfismo e inserções no gene 16S rRNA da cepa ATCC 17981 e isolados de *M. hyorhinis*.

Cepa	Posição do nucleotídeo															
	17	31	262	333	540	603	672	683	703	722	740	741	742	743	746	747
M hyor	A	G	G	C	T	T	G	A	T	A	A	G	C	A	C	-
002	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C
003	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
006	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C
008	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
010	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
035	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
036	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
060	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	A	G	C	A	C
067	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	-
072N	.	.	C	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
072T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
074	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
080	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
083T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
083P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
120	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C

- indica ausência de nucleotídeo

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

Continua

Continuação

TABELA 5 – Polimorfismo e inserções no gene 16S rRNA da cepa ATCC 17981 e isolados de *M. hyorhinis*.

Cepa	Posição do nucleotídeo														
	752	755	757	762	924	926	1336	1416	1417	1419	1420	1422	1424	1434	1438
M hyor	T	G	T	-	A	A	-	T	G	C	T	A	G	-	C
002	.	.	.	C	G	.	-	G	C	T	A	-	.	T	T
003	.	.	.	.	.	C	-	G	C	T	A	-	.	T	T
006	.	.	.	.	.	C	-	G	C	T	A	-	T	T	T
008	.	.	.	C	T	T	-	G	C	T	A	-	.	T	T
010	.	.	.	C	.	C	-	G	C	T	A	-	T	T	T
035	.	.	.	.	T	T	-	G	C	T	A	.	.	T	T
036	.	.	.	.	.	C	-	.	.	.	A	.	.	T	T
060	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	-	T	T
067	.	.	.	.	.	.	-	G	C	T	A	.	.	T	T
072	.	.	.	.	.	.	-	G	C	T	A	.	.	T	T
072T	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	.	T	T
074	.	.	.	.	.	.	-	G	C	T	A	-	.	T	T
080	.	.	.	.	.	.	.	G	C	T	A	-	.	T	T
083T	.	.	.	.	.	C	-	G	C	T	A	.	.	T	T
083P	A	T	-	C	.	C	-	G	C	T	A	-	.	T	T
120	.	.	.	.	.	.	-	G	C	T	A	-	.	T	T

- indica ausência de nucleotídeo

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

TABELA 6. Posições de polimorfismo e deleções no gene 16S rRNA das cepas de *M. hyopneumoniae* e isolado.

cepas	Posição do nucleotídeo															
	19	140	181	413	429	430	431	432	443	445	447	448	565	571	573	586
7448 ¹	A	G	C	G	C	T	A	G	C	C	A	G	T	T	A	A
MH ²	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
232 ³	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH ⁴	-	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
014 ⁵	-	.	T	A	T	A	G	A	A	T	T	A	C	C	G	G

Cepas de referencia (genbank)e isoladado: ¹(AE017244); ²(AE017243); ³(NC006360); ⁴(ATCC 25934); ⁵(ISOLADO)

- indica ausência de nucleotídeo

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

Cepa	Posição do nucleotídeo (continuação)																
	598	609	632	657	660	669	716	809	811	814	930	932	1404	1420	1431	1438	1440
7448 ¹	T	A	G	G	T	A	C	C	A	G	T	T	T	T	G	T	A
MH ²	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
232 ³	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.
MH ⁴	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	-	-	.	-	.
014 ⁵	C	G	A	A	C	G	T	A	T	T	A	A	-	-	-	.	C

Cepas de referencia (genbank)e isoladado: ¹(AE017244); ²(AE017243); ³(NC006360); ⁴(ATCC 25934); ⁵(ISOLADO)

- indica ausência de nucleotídeo

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

TABELA 7. Polimorfismo, inserções e deleções no gene 16S rRNA da cepa *M. flocculare* (acesso X62699)

	Posição dos nucleotídeos																	
	19	29	116	154	166	439	449	741	742	756	767	782	821	943	1417	1433	1441	1445
M flocc ¹	A	-	T	A	C	A	G	G	A	G	-	-	G	G	T	T	G	G
MF ²	-	G	.	.	.	-	.	A	G	.	C	C	C	A	-	-	.	-
09*	-	G	.	.	T	-	A	A	G	.	C	C	.	A	-	.	.	-
20*	-	G	C	C	T	-	A	.	.	C	-	-	.	T	-	-	T	-

Cepas de referencia (genbank)e isoladado: ¹(X62699); ²(ATCC 27716); * (ISOLADO)

- indica ausência de nucleotídeo

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

. indica o mesmo nucleotídeo da primeira linha

6 DISCUSSÃO

Várias metodologias são utilizadas no monitoramento das infecções causadas pelo *M. hyopneumoniae*. Sinais clínicos e a presença de lesões em órgãos do sistema respiratório auxiliam no diagnóstico da doença (ROSS, 1999), no entanto, testes laboratoriais são necessários no diagnóstico conclusivo. A utilização de técnicas com alta especificidade, de fácil aplicabilidade e baixo custo são fundamentais na realização do diagnóstico, que contribuem no controle das doenças respiratórias em suínos causadas por micoplasmas (PAGLIARINI, 2001).

Os métodos de cultivo, destinados ao isolamento bacteriano, continuam sendo o “padrão-ouro” em microbiologia. Na rotina de diagnóstico microbiológico das micoplasmoses, o cultivo e isolamento é pouco realizado no Brasil, sendo restrito a alguns laboratórios da Região Sudeste. Fatores limitantes como conhecimento das necessidades nutricionais do agente, contaminação por microrganismos oportunistas ou envolvimento de outros patógenos do CDRS, dificultam a implantação destes métodos na rotina laboratorial.

Para os micoplasmas de origem animal, há diferentes meios de cultura otimizados para o crescimento de cada espécie ou de um pequeno grupo de mollicutes. Geralmente os meios apresentam em sua composição uma base rica em nutrientes, usuais em bacteriologia, acrescida de soro animal. Os antibióticos são adicionados ao meio de cultura com o objetivo de evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis. Embora as composições dos meios de cultura para os mollicutes sejam similares, existem variações destinadas ao isolamento de uma espécie ou outra. O isolamento, cultivo e identificação de micoplasmas são trabalhosos e podem demorar quatro semanas ou mais (ASSUNÇÃO et al., 2005). O meio de cultura é de alto custo, o tempo transcorrido entre obtenção de material biológico e o seu processamento deve ser inferior a 24 horas e, em animais com infecções aparentes ou crônicas é indicada a coleta de mais de um sítio anatômico (SIMECKA et al., 1992).

Vários fatores inerentes ao hospedeiro, ao agente etiológico e ao meio de cultura são importantes no primo isolamento e na manutenção dos micoplasmas durante as primeiras passagens *in vitro*. Dentre estes incluem: adequação química e física do meio de cultura, número de microrganismos de interesse na amostra e

presença de substâncias tóxicas ou inibitórias no material clínico (TULLY e WHITCOMB, 1992).

O meio de cultura FM, utilizado no presente estudo, foi alterado pela adição de lactoalbumina, glicose, extrato de levedura fresco, bacitracina e meticilina e pela retirada do acetato de tálio, penicilina, polimixina B e cicloserina.

O uso de antibióticos com acetato de tálio, nos meios de cultura, aumenta a possibilidade de isolamento de micoplasma na presença de outros microrganismos que competem pelos nutrientes destinados ao crescimento dos mollicutes, presentes no material testado. A penicilina e a polimixina B, na concentração de 500 a 1000 unidades/mL, têm sido o antibiótico e antifúngico de escolha para inibição de bactérias (Gram-positiva e Gram-negativa) e fungos (TULLY, 1983).

Segundo Friis (1971, 1974), a bacitracina e meticilina têm ação bacteriostática e foi proposto o uso depois de demonstrado que a penicilina G, e outros derivados do benzil ou penicilina, tinha efeito inibitório na replicação do *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, quando presentes no meio de transporte e cultivo primário. O acetato de tálio, tóxico para células humanas e animais, pode inibir o crescimento de alguns mollicutes como ureaplasma e determinados micoplasmas (RAZIN, 2006). Na década de 80, foi confirmada a inibição de crescimento de *M. genitalium*, quando adicionado acetato de tálio ao meio de cultura (TAYLOR-ROBINSON et al., 1981; TULLY et al., 1983).

Entre as dificuldades encontradas no isolamento de micoplasmas, que acometem suínos, destacam-se os meios extremamente ricos e tempo de incubação acima de 30 dias (FRIIS, 1971). A utilização destes meios ricos acrescidos de antibióticos e antifúngicos, no primo isolamento, não é suficiente para evitar a contaminação de microrganismos indesejáveis, quando utilizados material biológico proveniente de muco nasal/tonsilar ou fragmento de pulmão, traquéia e tonsila de suínos. Com o objetivo de diminuir o risco de contaminação foi estabelecido o procedimento de filtração prévia, das amostras clínicas (muco nasal/tonsilar e fragmentos de órgãos macerados), em membrana de porosidade 0,45 µm, e diluições decimais no primo isolamento, como descrito por Oliveira (2008).

No presente trabalho, as alterações na metodologia de cultivo - filtração, alteração no meio de cultura (FM), centrifugação do macerado de fragmentos de órgão e incubação em agitação rotacional das amostras semeadas - proporcionaram o isolamento de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*.

No primo cultivo, em meio sólido, verificou-se que 01 isolado (fragmento de pulmão) apresentou acidificação do pH com 21 dias e 02 isolados (muco nasal/tonsilar) com 40 dias, tempo semelhante ao observado nos isolados obtidos por Kobish e Friis (1996), mas superior aos outros 56 isolados, obtidos no presente estudo, que apresentaram crescimento entre 7 a 14 dias. Após a realização da PCR-Multiplex, estes dois isolados (muco nasal/tonsilar) foram identificados como *M. flocculare* e o outro (fragmento de pulmão) como *M. hyopneumoniae*, com 40 e 21 dias de crescimento, respectivamente. Assunção et al. (2005) obtiveram isolamento de *M. hyopneumoniae* com 2 a 6 semanas e *M. flocculare* com aproximadamente 9 semanas, justificando o tempo prolongado pela utilização de apenas soro equino no meio de cultura.

O *M. hyorhinis* foi o agente mais freqüentemente isolado em amostras clínicas de muco nasal/tonsilar e órgãos de suínos com problemas respiratórios, quando comparado aos isolados obtidos de *M. flocculare* e *M. hyopneumoniae*. Esses resultados estão de acordo com os achados de Assunção et. al. (2005) e Palzer et. al. (2008), que também obtiveram maior número de isolados de *M. hyorhinis* de pulmão de animais com sinais clínicos de pneumonia. Entre os isolados clínicos, de animais com problemas respiratórios, neste trabalho, não foi obtida cultura mista com espécies de micoplasmas, sugerindo o *M. hyorhinis* como possível agente causal em distúrbios respiratórios. Schulman e Estola (1966) inocularam *M. hyorhinis* (chamado de agente PES) em suínos e observaram doença semelhante à pneumonia enzoótica. Até recentemente, o *M. hyopneumoniae* era a única espécie considerada agente primário da PES, sendo o *M. hyorhinis* e outras espécies bacterianas classificadas como secundárias. Entretanto, pesquisas recentes sugerem que o *M. hyorhinis* pode ser agente primário da PES. Lin et al. (2006), por meio de inoculação experimental em suínos com isolado clínico de *M. hyorhinis*, obtido de um animal com pneumonia, constataram os mesmos sinais clínicos da PES com re-isolamento apenas do *M. hyorhinis*, confirmando seu papel como agente primário.

O isolamento *M. hyopneumoniae*, a partir de animais naturalmente ou experimentalmente infectados, é considerado o padrão ouro no diagnóstico da PES. Entretanto, o tempo prolongado de incubação (4 a 8 semanas) para multiplicação do agente, determina a inviabilidade deste procedimento para o diagnóstico de rotina (ROSS, 1999; THACKER, 2004; MAROIS et al., 2007; YAMAGUTI et al., 2008).

A obtenção de 01 isolado de *M. hyopneumoniae*, no presente estudo, pode estar relacionada aos diferentes tempos de crescimento entre as espécies de micoplasmas encontradas em suínos. O tempo de crescimento do isolado de *M. hyopneumoniae* foi de 21 dias e dos *M. hyorhinis* entre 3 a 7 dias, concordando com Friis (1971). Os dois isolados de *M. flocculare* apresentaram crescimento com 40 dias de incubação, concordando com Assunção et al. (2005). Stemke et al. (1994) consideraram o isolamento do *M. flocculare* mais difícil que o *M. hyopneumoniae*, porém Assunção et al. (2005) obtiveram 24 e 33% de isolamento de *M. flocculare* e *M. hyopneumoniae*, respectivamente, em pulmão. Métodos melhorados para isolamento de *M. hyopneumoniae* têm sido descritos por Friis (1975), Gois et al. (1975), Goodwin (1976) e Etheridge et al (1979), entretanto, este agente continua sendo o mais difícil de isolar entre as espécies de micoplasmas relatadas em suínos. A obtenção de um único isolado de *M. hyopneumoniae* pode estar associada ao crescimento mais rápido do *M. hyorhinis*, que possivelmente impediu o crescimento do *M. hyopneumoniae*, nas amostras clínicas processadas neste trabalho. Estudo nutricional das necessidades dos micoplasmas, principalmente para *M. hyopneumoniae*, deverá ser realizado não apenas para descrever fatores que influenciam o crescimento e isolamento, mas também para demonstrar como as condições de nutrição e cultivo podem afetar a bioquímica, fisiologia e morfologia destes microrganismos e influenciar a adaptação genética de estirpes (MILES, 1992). Segundo Wittlestone (1979), Zielinsky e Ross (1990), Vicca (2003) o aumento de passagem *in vitro* de isolados de *M. hyopneumoniae* pode diminuir a sua virulência e conseqüentemente, resultar em diferenças de patogenicidade entre os isolados.

Ross e Whittlestone (1983) sugeriram a utilização de soro anti-*M. hyorhinis*, adição cicloserina e extrato de levedura e aumento do percentual de soro no meio de cultura (25 a 27%) para beneficiar o isolamento do *M. hyopneumoniae*, na presença de *M. hyorhinis*. No presente estudo, o meio de cultura FRIIS foi alterado para favorecer o isolamento do *M. hyopneumoniae*, entretanto, não foi adicionado anti-soro para *M. hyorhinis*, devido a sua indisponibilidade. Embora o uso de anti-soro seja indicado, Assunção et al. (2005) obtiveram 33% de isolamento de *M. hyopneumoniae*, de fragmento de pulmão, sem a sua adição em meio de cultura. A utilização de antibióticos e outros quimioterápicos, na alimentação dos animais, são

limitações que podem impedir o crescimento do *M. hyopneumoniae in vitro* (RIBEIRO et al., 2004).

O primeiro isolamento, no Brasil, de *M. hyopneumoniae* ocorreu em 2002, proveniente de fragmento de pulmão, pela Embrapa de Santa Catarina. Este isolado (cepa 7448), utilizado no projeto Genoma Sul, teve o seu genoma completo sequenciado em 2007. No Brasil, nosso trabalho relata o segundo isolamento de *M. hyopneumoniae*, sendo o primeiro da região sudeste. O isolamento deste agente, não somente tem relevância no diagnóstico, como também é indispensável para iniciar investigações epidemiológicas, estudo de variações genéticas de microrganismos isolados de campo e, principalmente na produção de vacina.

O diagnóstico laboratorial de infecções causadas por micoplasmas é usualmente realizado pela detecção de anticorpos específicos ou cultivo. A alta variabilidade antigênica, presente nas espécies de micoplasmas, dificulta os diagnósticos (YOGEV, 1991). O cultivo pode ser prejudicado pelo tipo de amostra clínica, método de coleta, transporte e tempo no processamento das amostras, exigências nutricionais e número de microrganismos desejáveis e indesejáveis presentes nas amostras clínicas (BUZINHANI, 2001; OLIVEIRA, 2008). Embora o diagnóstico definitivo seja fundamentado pelo isolamento do agente e de suas características fenotípicas, a identificação ainda é presuntiva, baseada principalmente na fermentação da glicose, hidrólise de arginina ou uréia e características morfológicas e formação de filmes e manchas associada à origem da amostra clínica (GOLL, 1994).

As técnicas de diagnóstico molecular são usualmente indicadas para o uso rotineiro na detecção de microrganismos que crescem lentamente *in vitro*, requerem meio de cultura complexo e tempo de incubação prolongado. No caso dos *Mollicutes*, os parâmetros de dificuldade de crescimento evidenciam a necessidade do uso rotineiro de técnicas moleculares, sendo a PCR de ampla aplicabilidade na medicina veterinária, para detecção destes agentes em diferentes estágios da doença (RAZIN et al., 1987; BUZINHANI, 2001).

Testes sorológicos como fixação de complemento, HI e ELISA têm sido desenvolvidos para detecção de anticorpos para *M. hyopneumoniae* em soros de suínos (ROSS, 1999), no entanto, várias divergências entre as técnicas foram relatadas (PAGLIARINI, 2001).

A sensibilidade dos testes de ELISA para *M. hyopneumoniae* pode ser influenciada pela baixa interação do agente com o sistema imune sistêmico, devido ao sítio anatômico de colonização, que resulta em testes falsos negativos. Outra dificuldade na aplicabilidade deste teste está relacionada à variação de proteínas de superfície do *M. hyopneumoniae*, que resulta em resposta de anticorpos variáveis (THACKER, 2004). Reações cruzadas entre *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e *M. hyorhinis* reduzem a especificidade do teste.

A diferenciação dos isolados para fins epidemiológicos, identificação e diagnóstico laboratorial das infecções causadas por mollicutes, têm sido baseadas em testes bacteriológicos clássicos, incluindo morfologia, características da colônia, propriedades fisiológicas e sorológicas. Entretanto, estas técnicas são interpretadas como características não tipáveis e podem apresentar baixa reprodutibilidade (VESSALIC et al., 1993).

A PCR desenvolvida para amplificar DNA de vários mollicutes tem resultado em grande contribuição no diagnóstico das micoplasmoses (NASCIMENTO et al., 1991; LAUERMAN et al., 1994). Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade sem a necessidade de isolamento do agente, e ainda, pode ser destinada na identificação de isolados de micoplasmas (NASCIMENTO et al., 1993).

A PCR-Multiplex, uma variação da PCR, tem sido utilizada na detecção e/ou identificação simultânea de espécies de micoplasmas presente em material biológico do mesmo hospedeiro (CHOPPA et al., 1998; CARON et al., 2000; GRECO et al., 2001; STELLRECHT, 2004; STAKENBORG, 2005; LIN, et al, 2006) ou na detecção de diferentes bactérias envolvidas em doenças multifatoriais, nas quais os micoplasmas encontram-se presentes (MAHONY, et al., 1997; PANG, et al., 2002; MIYASHITA et al., 2004).

Neste trabalho, a PCR-Multiplex foi utilizada na identificação dos isolados de micoplasmas, obtidos de material biológico de suínos, associada às características morfológicas e bioquímicas. Stakenborg (2005) descreveu, pela primeira vez, uma PCR-Multiplex para detecção de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, com fragmentos amplificados de 1129, 1000 e 754 pb, respectivamente. A substituição do “primer reverse”, citado por Stakenborg et al. (2005), na PCR-Multiplex pelo MYrev, resultou em fragmentos de 856 pb para *M. hyorhinis*, 728 pb para *M. hyopneumoniae* e 482 pb para *M. flocculare*.

Na PCR-Multiplex é desejável a obtenção de fragmentos com pesos moleculares próximos, objetivando a amplificação adequada dos fragmentos, uma vez que, o tempo de elongação é igual para todos. Os produtos amplificados, utilizando-se o “primer forward” (Stakenborg et al. 2005) e o MYrev, foram inferiores a 900 pb, o que possibilitou melhor visualização no gel com agarose para fragmentos menores que 1000 pb (Invitrogen®). Neste trabalho, isolados identificados na PCR-Multiplex tiveram o gene 16S rRNA seqüenciado para a confirmação das espécies, resultando em congruência de 100%. Esta metodologia foi adequada para identificação de DNA obtidos de cultura pura, entretanto, é necessário realizar teste de sensibilidade e especificidade para sua implementação como diagnóstico laboratorial, em material biológico de suínos, das espécies de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* e *M. flocculare*

A identificação rápida e confiável de isolados clínicos continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos. Nos últimos anos, o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana foi decorrente do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, que aumentaram significativamente a disponibilidade de métodos que permitiram a identificação e classificação mais rápida e precisa dos microrganismos. Neste grupo de análise genotípica estão as tecnologias da PCR, seqüenciamento automatizado, eletroforese de “pulsed-field” e sondas de oligonucleotídeos (STRALIOTTO, 1997).

Estudos epidemiológicos podem ser realizados por métodos fenotípicos e genotípicos e são importantes na determinação da heterogeneidade entre espécies, como também na mesma espécie, de acordo com origem geográfica ou data de isolamento. Um método de tipagem ideal deverá resultar em perfil idêntico entre isolados relacionados epidemiologicamente e, diferente de outros isolados não relacionados (LIPUMA, 1998).

Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas, baseada em características fenotípicas, cedeu espaço às abordagens genotípicas, entre elas, a PFGE é uma das técnicas mais aceitas e utilizadas (TENOVER et al., 1995; MIRAGAIA et al., 2002). O parâmetro para a separação de fragmentos digeridos depende do microrganismo, da enzima e do aparelho da PFGE. A adequação destas condições pode ser realizada a partir de adaptações de protocolos publicados ou empiricamente (STRUELENS et al., 2001). Existem fatores críticos que interferem na

obtenção do DNA cromossomal íntegro para a digestão enzimática, como: subcultivo, tampões de lavagens e tempo de centrifugação.

Neste trabalho, dos 56 isolados de *M. hyorhinis* subcultivados, 40 apresentaram crescimento em 12 mL de cultura, para a realização da PFGE. Nos outros 16 isolados, não foi observado crescimento na expansão de 2mL de cultura (com crescimento em meio sólido e líquido) para 10 mL. Os isolados de *M. hyorhinis*, obtidos no presente estudo, apresentaram tempos de crescimentos diferentes, o que dificultou a observação do início da acidificação do meio para realização do subcultivo. Segundo Ross e Whittlestone (1983), estes microrganismos são sensíveis a pH baixo e possivelmente, no momento do aumento do inóculo para 12 mL, os *M. hyorhinis* já estavam inviáveis para crescimento, devido à acidificação do meio.

Diferentes tempos de centrifugação e soluções tamponantes, têm sido descrito por vários autores para a realização da PFGE com micoplasma e ureaplasma (MAROIS et al., 2001; KOKOTOVIC et al., 2002; STAKENBORG et al., 2005; MOSER et al., 2006), entretanto, ainda não há descrição desta técnica para *M. hyorhinis*. Neste trabalho, a padronização do tempo de centrifugação (20 minutos) e utilização de PBS na lavagem do sedimento foi importante para a obtenção de DNA íntegro de *M. hyorhinis*. Stakenborg (2005) e Moser et al. (2006) descreveram bons resultados na utilização de solução tamponante PBS, concordando com nosso experimento.

O perfil gerado na PFGE deve conter números de fragmentos suficientes para discriminar os isolados, porém não tão grande que impeça a sua análise e agrupamento (SADER et al., 1994; TENOVER et al., 1997; TAMBIC et al., 1999). Para cada espécie deve ser aplicada uma enzima de restrição que melhor indique as variações entre os isolados de micoplasmas. A utilização das enzimas *AvaI* e *XhoI*, na digestão do DNA do *M. hyorhinis*, resultaram em melhores perfis na PFGE, com um número de fragmentos adequado para análise. Há um consenso entre os pesquisadores que sugerem a *SmaI* na tipificação de micoplasmas e ureaplasmas, entretanto, os resultados obtidos neste trabalho com esta enzima, gerou 1 a 3 fragmentos, insuficientes na diferenciação dos isolados de *M. hyorhinis*. Cousin-Allery et al. (2000) testaram nove enzimas na tipificação do *M. pneumoniae*, pela PFGE, e obtiveram resultados satisfatórios com apenas a *Apal*. As enzimas *BamHI*, *SaII*, *PstI*, *XbaI*, *SmaI* e *NaeI*, testadas no presente estudo, na padronização da

PFGE, resultaram em perfis não discriminatórios e, portanto, não são indicadas na tipificação do *M. hyorhinis*.

As alterações nos parâmetros para PFGE, aplicados aos isolados de *M. hyorhinis*, permitiu a tipificação de 65% com a enzima *AvaI* e 57,5% com a *XhoI*. Marois et al. (2001), Buzinhani et al. (2006) e Oliveira (2008) obtiveram tipificação de 89% com isolados de *M. synoviae*, 70,2% de *U. diversum* e 50% de *Ureaplasma* spp, respectivamente.

A PFGE dos 40 isolados de *M. hyorhinis*, estudados neste trabalho, resultou em diferentes “clusters”. Estes isolados foram obtidos de diferentes sítios anatômicos (muco nasal/tonsilar, fragmentos de pulmão/traquéia) de suínos com problemas respiratórios provenientes de diferentes regiões geográficas, no período de 2005 a 2007, justificando a heterogeneidade encontrada na PFGE. Stakenborg (2005) e Kokotovic et al. (2002) relataram, pela PFGE, grande heterogeneidade entre isolados de *M. hyopneumoniae* e *M. hyosynoviae*, respectivamente, em suínos provenientes de diferentes rebanhos. As consequências e relevâncias das variações genotípicas nas funções biológicas dos micoplasmas são desconhecidas, bem como a causa da diversidade encontrada (BÉBÉAR et al., 1996).

O protocolo da PFGE utilizado na tipificação dos isolados de *M. hyorhinis*, foi útil e reprodutível, embora esta técnica apresente pontos críticos durante sua execução principalmente no estudo de variação genotípica dos mollicutes. A escolha dos métodos para tipificação de isolados depende da reprodutibilidade da metodologia e do microrganismo a ser investigado. A exigência nutricional e o tempo de crescimento do *M. hyorhinis* em meio de cultura, determinam um fator limitante para a realização da PFGE.

A seqüência do genoma bacteriano é a base de comparação por excelência, mas na impossibilidade de sua completa determinação, tem sido válida a análise sistemática da seqüência da subunidade 16S rRNA ou da seqüência do gene que codifica esta estrutura no DNA genômico. O seqüenciamento do gene que codifica o 16S rRNA permite proceder a elaboração de árvores filogenéticas em grupos evolutivos de bactérias próximas e observar as suas relações de ancestralidade (RAZIN, 2006).

A introdução de tecnologias fundamentadas em genética molecular, no estudo dos micoplasmas, contribuiu para a classificação de novas espécies, desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e auxílio no conhecimento dos

processos pelos quais esses microrganismos alteram a integridade fisiológica das células hospedeiras (YAMAMOTO et al., 1994; DYBVIG e VOELKER, 1996).

Atualmente, seqüências completas ou parciais do gene 16S rRNA de muitos *Mollicutes* estão disponibilizadas em bancos de dados como o GenBank. O seqüenciamento de genes é uma técnica que facilita a genotipagem de espécie, devido ao uso de pequenas concentrações de DNA. A utilização do gene 16S rRNA gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas. Apesar do 23S rRNA conter duas vezes mais informações e, portanto, gerar maior acurácia nas inferências filogenéticas, a molécula menor (16S rRNA) tornou-se referência, devido a maior facilidade de seqüenciamento. Por outro lado, o 23S rRNA tem sido utilizado como suplemento para os dados gerados do 16S rRNA em estudo de microrganismos intimamente relacionados (STAHL, 1997). O seqüenciamento do gene 16S rRNA é indicado na exploração da diversidade microbiana de amostras naturais (MUYZER, 1993) e detecção de diferenças entre isolados da mesma espécie e serem aplicadas nos estudos epidemiológicos das doenças bacterianas. Para esse efeito, utiliza-se a amplificação de genes pela PCR e posterior seqüenciamento. As seqüências alvo incluem genes para proteínas de superfície, resistência a antibióticos e, mais freqüentemente, o 16S rRNA (ALVES et al., 2003).

Neste trabalho, o seqüenciamento do gene 16S rRNA foi utilizado para verificar a presença de polimorfismos intraespecíficos de isolados de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*. O produto de 1500 pb obtidos da amplificação com os “primers” universais, descrito por Harasawa e Cassel (1996), quando seqüenciado, não apresentou leitura de aproximadamente 500 bases referente à região interna do gene 16S rRNA. Desta forma, foram desenvolvidos os “primers” RCO3/RCO4, que amplificou um fragmento de aproximadamente 700 pb, contendo regiões conservadas dentro da mesma espécie, mas variáveis entre as espécies de micoplasma de interesse na suinocultura.

Nos estudos de seqüenciamento do gene 16S rRNA de bactérias, o ponto de corte de aproximadamente $\geq 97,5\%$ de similaridade é utilizado na classificação intraespecífica, e abaixo desse valor, classificado como interespecífica (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994). As três espécies de micoplasmas (*M. hyopneumoniae*: ATCC 25934; *M. hyorhinis*: ATCC 17981 e *M. flocculare* ATCC 27716), seqüenciadas neste trabalho, com os “primers” RCO3/RCO4, foram agrupadas no dendrograma com *M. flocculare* (X62699), *M. hyopneumoniae*

(AE017244; AE017243; NC006360) e *M. hyorhinis* (EU714234) disponibilizadas no GenBank, quando utilizado o ponto de corte descrito por Stackenbrant e Goebel (1994).

O dendrograma obtido, pelas seqüências primárias de nucleotídeos do gene 16S rRNA amplificados pelos “primers” F16S/R16S e RCO3/RCO4, resultou em grupamentos semelhantes ao dendrograma com RCO3/RCO4. Os seqüenciamentos obtidos pelo RCO3/RCO4 (700 bases) e o F16S/R16S/RCO3/RCO4 (1438 bases) determinaram a diferenciação interespecífica para as cepas de referência *M. hyopneumoniae*: ATCC 25934; *M. hyorhinis*: ATCC 17981 e *M. flocculare*: ATCC 27716. A importância deste gene na identificação de espécies de mollicutes foi reconhecida em 1997 pelo SubComitê de Taxonomia de *Mollicutes* (RAZIN, 2006).

A cepa de referência *M. hyorhinis* ATCC 17981, não disponível no GenBank e seqüenciada neste trabalho, foi utilizada na avaliação intraespecífica dos isolados estudados, e para a avaliação interespecífica, utilizou-se a ATCC 29052 disponível do GenBank. As diferenças encontradas entre as ATCC 17981 e 29052 de *M. hyorhinis* foram de 10 posições polimórficas.

No seqüenciamento de 1438 bases (gene 16S rRNA) de 18 isolados de *M. hyorhinis*, quando comparados a ATCC 17981, 15 apresentaram polimorfismos entre 0 a 21 posições e, três isolados com posições polimórficas superiores a 21, provavelmente devido a erros no seqüenciamento. No isolado “060 Pulmão”, a inserção de uma base na posição 740 resultou em três polimorfismos nas posições 741 a 744 e, no “083 Traquéia” e “017 Nasal” foram detectados 32 e 37 posições polimórficas, respectivamente.

As variações polimórficas encontradas nos isolados de *M. hyorhinis* não podem ser comparadas a dados na literatura, pois há relato apenas do seqüenciamento de gene 16S rRNA de duas cepas de referência desta espécie e de outras. O gene 16S rRNA é mais conservado quando comparado aos genes de proteínas, embora tenha regiões com variabilidade que permita a classificação de grande número de bactérias. O número de polimorfismos no gene 16S rRNA, encontrados entre a cepa e isolados de micoplasmas, são variáveis e as variações intraespecíficas podem ser maiores que as interespecíficas (JOHANSSON et al., 1998). Königsson et al., (2003) avaliaram o seqüenciamento do gene 16S rRNA de 17 isolados de *M. agalactiae* e 8 de *M. bovis* e encontraram 21 e 12 posições polimórficas, respectivamente, porém a análise interespecífica determinou somente

quatro posições polimórficas. A análise do seqüenciamento do gene 16S rRNA da cepa de referência *M. genitalium* G37 e quatro isolados, apresentaram apenas um polimorfismo (JENSEN et al., 2003), enquanto que a análise de isolados da espécie *M. capripneumoniae* variou de 11 a 17 nucleotídeos (HELDTANDER et al., 2001; PETTERSSON et al., 1998).

O gene 16S rRNA da cepa ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*, seqüenciado neste trabalho, foi comparado a seqüência disponível no GenBank e não apresentou polimorfismo, entretanto, detectou-se 4 deleções na cepa de referência seqüenciada. O isolado “014 Pulmão” e a cepa ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae*, que tiveram seus genes 16S rRNA seqüenciados neste trabalho, foram comparados entre si e resultou em 25 posições polimórficas no isolado. No GenBank, estão disponíveis os seqüenciamentos completos dos isolados de *M. hyopneumoniae* originário dos EUA (232) e do Brasil (7448). Na comparação da seqüência do gene 16S rRNA do isolado “014 Pulmão” com o 232 e o 7448, foram detectadas 25 e 28 posições polimórficas, respectivamente. Estas variações podem ser justificadas pela origem geográfica dos isolados (EUA e Santa Catarina/BR) além da data de isolamento. Clayton et al. (1995) sugeriram que as diferenças encontradas nas seqüências do gene 16S rRNA, depositadas no GenBank, podem ser explicadas não somente por erros obtidos no seqüenciamento, mas por prováveis variações intraespecíficas. Heterogeneidade entre cepas de *M. hyopneumoniae* foi observada através de teste de inibição do metabolismo, digestão com enzimas de restrição, PCR, perfil total de proteínas e perfil de glicoproteínas (DESROSIERS, 2001). Stankborg (2005), utilizando a PFGE com 43 isolados de *M. hyopneumoniae*, provenientes de diferentes rebanhos, encontrou alta variabilidade.

No GenBank está disponível somente o gene 16S rRNA de um isolado de *M. flocculare* obtido de suíno, portanto, a cepa de referência 27716 de *M. flocculare* foi seqüenciada neste trabalho para análise intraespecífica e interespecífica. O polimorfismo encontrado no gene 16S rRNA dos isolados “009 Tonsila” e “020 Nasal” com a cepa de referência foi de 05 e 07, respectivamente. Quando estes isolados foram comparados ao gene do isolado disponível no genBank, observou-se entre 05 a 06 polimorfismos.

O processo de subtipagem é importante na epidemiologia para o reconhecimento de surtos infecciosos, detecção de transmissão cruzada de patógenos nosocomial, determinação da fonte de infecção, reconhecimento de

cepas virulentas e monitoramento de programas de vacinação (OLIVE e BEAN, 1999). O seqüenciamento do gene 16S rRNA permitiu o estudo de variabilidade interespecífica e intraespecífica de micoplasmas e, na impossibilidade do seqüenciamento completo deste gene, pode-se utilizar os “primers” RCO3/RCO4 na tipificação de micoplasmas suínos, provenientes de diferentes sítios anatômicos e regiões geográficas.

Os polimorfismos intraespecíficos nos isolados *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae* confirmam a necessidade de avaliação dos “primers” disponíveis atualmente na literatura. O isolamento de micoplasmas suínos é de fundamental importância nos estudos de variações genotípicas, principalmente o gene 16S rRNA, que fornece informações para fundamentar os testes de diagnóstico e de identificação, por meio da PCR com “primers” que amplificam esta região. Variações podem ocorrer em regiões-alvo de hibridização dos “primers”, resultando em potencial risco na obtenção de falso-positivo ou negativo que invalidam o método da PCR no diagnóstico e identificação.

7 CONCLUSÕES

- o meio de cultura FM e a técnica de cultivo proporcionaram o isolamento de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*;
- a utilização da PCR-Multiplex, com o “primer reverse” MYrev, foi eficiente na identificação dos isolados *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*;
- a PFGE, com as enzimas *Ava*I e *Xho*I, apresentou reprodutibilidade e poder discriminatório na análise de variação genotípica de isolados de *M. hyorhinis*;
- o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, com os “primers” RCO3/RCO4, permitiu o agrupamento interespecífico e intraespecífico dos isolados de *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* e cepas de referência;
- as 1438 bases seqüenciadas, do gene 16S rRNA, do *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* e cepas de referência, com os “primers” F16S/R16F/RCO3/RCO4, permitiu detectar polimorfismos entre os isolados e cepas de referência;
- as variações encontradas, no gene 16S rRNA dos isolados de micoplasma suínos, devem ser empregadas na avaliação da seqüência de “primers” utilizados no diagnóstico dessas espécies.

REFERÊNCIAS*

- ABIVEN, P. et al. A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. **Mol. Cell. Probes**, v.6, p.423-429, 1992.
- AHRENS, P.; FRIIS, N. F. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with DNA probe. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.12, p.249-253, 1991.
- ALBERTON, G. C. et al. Exame anatomopatológico, microbiológico, citológico e físico-químico das articulações de suínos artríticos no matadouro. **Arch. Vet. Sci.**, v.8, n.1, p.81-91, 2003.
- ALFIZAH, H. et al. DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a teaching hospital in Malaysia. **Méd. J. Malaysia**, v. 57, n. 3, p.:319-328, 2002.
- ALVES, A. **Tipagem genética de microrganismos**, 2003, 24 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.
- AMADOR, J. P. **Agronegócio suinícola**. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 19., 1999, Rio de Janeiro. 1 CD-ROM.
- ANUÁRIO DA PECUARIA BRASILEIRA - ANUALPEC – Anuário Estatístico Agropecuário. São Paulo: FNP Consultoria, 2002, 400p.
- ARBEIT, R. D. Laboratory procedure for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1995. p.190-208.
- ARMSTRONG, C. H. et al. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosing mycoplasmal pneumonia of swine. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 27., 1978, Buffalo. **Proceedings...** New York, 1978.
- ARMSTRONG, C. H. Porcine mycoplasmas. In: WITHFORD, H. W.; ROSENBUSH, R. F.; LAUERMAN, L. H. **Mycoplasmosis in Animal: Laboratory Diagnosis**. Iowa State Univ. Press, 1994. p.68-82.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. **Anuário da suinocultura industrial**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 23 jan. 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSUNÇÃO, P. et al. The occurrence of mycoplasma in the lung of swine in Gran Canaria (Spain). **Vet. Res. Commun.**, v. 29, n. 6, p. 453-462, 2005.

BACCARO, M. R. et al. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. **Vet. J.**, v.172, p.526-531, nov. 2006.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* através da PCR em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABRATES, 1999. p.163-164.

BARCELLOS, D. E. S. N. ; BOROWSKI, S. M. ; ALMEIDA, M. N. Programas de vacinação para diferentes sistemas de produção. In: CONGRESSO DA ABRATES, 13., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 2007. v.1, p. 54-67.

BARRAGRY, T. B. Pig diseases and modern veterinary vaccines. **Irish Vet. News**, v.13, p. 28-33, 1991.

BARROS, G. S. C. et al. **Agronegócio brasileiro**: perspectivas, desafios e uma agenda para seu desenvolvimento. Documento do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Piracicaba: CEPEAESALQ/USP, 2006.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: Sophisticated, remerging, and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, p. 21-32, 1997.

BÉBÉAR, C. M. et al. *Spiroplasma citri* virus SpV1: characterization of viral sequences present in the spiroplasmal host chromosome. **Curr. Microbiol.**, v.32, p. 134-140, 1996.

BLANCHARD, B. et al. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v.30, p.329-341, 1992.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microb.**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

BORGES, C. **A filière suínola em Santa Catarina**. 1993, 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.

BURCHRIESER, C. et al. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 207-213, 2003.

BUZINHANI, M. et al. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p. 1368-1375, 2007.

BUZINHANI, M. **Detecção de micoplasma em fêmeas bovinas apresentando distúrbios reprodutivos por meio de cultura e reação em cadeia da polimerase.** 2001, 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BUZINHANI, M. **Identificação sorológica e diversidade genotípica das estirpes de *Ureaplasma diversum* isoladas do trato reprodutivo bovino.** 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAMPOS, C. S. S.; CAMPOS, R. S. Soberania alimentar como alternativa ao agronegócio no Brasil. **Rev. Elect. Geo.Cien. Social.** Barcelona: Universidad de Barcelona, v. 11, n. 245 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ub.es/geocrit/sn/sn-24568.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2009.

CARLE, C. Isolation of large DNA fragments from agarose gels using agarose. **Trends Genet.**, v.5, p. 41-45, 1989.

CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR and amplification of the p36 and p46 genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1390-1396, 2000.

CARSON, J. L.; HU, P. C.; COLLIER, A. Cell structural and functional elements. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.** Washington, American Society for Microbiology, 1992, p. 63-72.

CAVALIER-SMITH, T. The origin of eukaryotic and aschaebacterial cell. **Nature**, v. 256, p. 463-468, 1987.

CHOPPA, P. C. et al. Multiplex PCR for detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. **Mol. Cell. Probes**, v.12, p. 301-308, 1998.

CHRISTENSEN, G. et al. Diseases of the respiratory system. In: STRAW, S.E. et al. **Diseases of swine.** 8. ed. Ames : Iowa State University, 1999. p. 913-940.

CLAYTON, R. A, et al. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 595-599, 1995.

COLWELL, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: LIZUKA, H.; HASEGAWA, T. (Ed.). **Culture collections of microorganisms**. Tokyo: University of Tokyo Press, 1970. p. 421-436.

COSTA, M. M. et al. Aspectos fenotípicos, genotípicos e de diagnóstico da bactéria *A. pleuropneumoniae*. **Ciê. Rural**, v.34, n.4, p.1305-1313, 2004.

COUSIN-ALLERY, A. et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. **Epidemiol. Infect.**, v. 124, p. 103-111, 2000.

DAGA, J. et al. Análise da adequação ambiental e manejo dos dejetos de instalações para suinocultura em propriedades na região oeste do paraná. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, v. 27, p. 587-595, 2007.

DAL BEM, E. L. **Epidemiologia e anatomopatologia de lesões pulmonares de suínos em um matadouro em Cascavel – PR**. 2008, 62 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DALL COSTA, O. A. et al. **Fatores de risco associados à rinite trófica progressiva e pneumonias crônicas nas fases de crescimento e terminação**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 2000. 4 p. (EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 267).

DESROSIERS, R. A review of some aspects of the epidemiology diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. **Swine Health Prod.**, v. 9, p. 233-237, 2001.

DINTER, Z. D.; DANIELSON, D.; BAKOS, K. Differentiation of porcine mycoplasma strains. **J. Gen. Microbiol.**, v. 42, p. 77-81, 1965.

DONE, S. H. Enzootic pneumonia (mycoplasmosis) revisited. **Pig J.**, v. 38, p. 40-61, 1997.

DUBOSSON, C. R. et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical sample. **Vet. Microbiol.**, v.102, p.55-65, 2004.

DYBVIG, K; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.50, p. 25 - 27, 1996.

Embrapa Suínos e Aves. **Sistemas de Produção 2**. Versão Eletrônica Jan/2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos/importancia.html>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

ESTOLA, T.; SHUMAN, A. Isolation of SEP agent from pigs with enzootic pneumonia in Finland. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 113-123, 1966.

ETHERIDGE, J. R.; COTTEW, G. S.; LLOYD, L. C. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. **Aust. Vet. J.**, v. 55, p. 356-359, 1979.

FEENSTRA, A. A. et al. Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 13., 1994, Bangkok, Thailand. **Anais...** Bangkok: Edited by Prachak Poomvises & Pringsri Ingkaninum, 1994. p.26-30.

FELD, N. C. et al. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vet. Microbiol.**, v.30, p. 35-46. 1992.

FERREIRA, A. S.; LIMA, K. R. S. As raças nacionais de suínos serão extintas? **Ação Ambiental**, v.3, p. 24-26, 2001.

FRASER, C. M. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v.270, p. 390-403, 1995.

FREY, J. Mycoplasmas of animals. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 23-90.

FRIIS, N. F. Isolation and characterization of a new porcine mycoplasma. **Acta Vet. Scand.** v.13, p. 284-286, 1972.

FRIIS, N. F. Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. **Acta Vet. Scand.** v.12, p. 69-79, 1971.

FRIIS, N. F. *Mycoplasmas suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies. **Acta. Vet. Scand.**, v.15, p. 507-518, 1974a.

FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. **Nord. Vet. Med.**, v. 27, p. 337-339, 1975.

FRIIS, N. F. The pathogenicity of mycoplasma flocculare. **Acta Vet. Scand.** v.14, p. 344-346, 1974b.

FRIIS, N. F.; FEENSTRA, A. A. *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. **Acta. Vet. Scand.**, v. 35, p. 93-98, 1994

FUTO, S. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by using rRNA – oligodeoxynucleotide hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p. 1509-1513, 1992.

GARDELLA, R. S.; DEL GIUDICE, R. A. Hemagglutination, hemdsorption, and hemolysis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983, v.1, p. 379-390.

GASANOV, U. HUNGHERS, D. HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, 2p. 851-875, 2005.

GIRAD, M. Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 1253-1261, 2001.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 14, p. 595-600, 1998.

GOIS, M. et al. Incidence and evaluation of the microbial flora in the lungs of pigs with enzootic pneumonia. **Zentralbl. Vet. Med. Reihe B.**, v. 22, p. 205-219, 1975.

GOIS, M.; VALICEK, L; SOVADINA, M. *Mycoplasma hyorhinis*, a causative agent of pig pneumonia – Communication 1. **Zbl. Vet. Med.**, v.15, p.230- 240, 1967.

GOLL JR, F. Identification of Mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Ames: Iowa State University Press, 1994. p.15-26.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura brasileira. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 71, p. 1-5, 2006.

GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. Roots of bacterial systematics. In: **HandBook of new bacterial systematics** (Ed.). London: Academic Press, 1993, p. 3-54.

GOODWIN, R. F. W. An improved medium for the isolation of *Mycoplasma suis*. **Vet. Rec.**, v. 98, p. 260-261, 1976.

GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P.; WHITTLESTONE, P. Characterization of *M. suis* and mycoplasma causing enzootic pneumoniae. **J. Hyg.**, v. 66, p. 595-603, 1967.

GOODWIN, R. F. W.; POMEROY, A. P.; WHITTLESTONE, P. Production of enzootic pneumonia with a mycoplasma. **Vet. Rec.**, v.77, p. 1247-1249, 1965.

GOODWIN, R. F. W; WHITTLESTONE, P. Production of Enzootic Pneumonia in pigs with an agent grown in tissue culture from the natural disease. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 44, p 291-299, 1963.

GOYAL, S. M. Porcine reproductive and respiratory virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, p. 656-664, 1993.

GRECO, G. et al. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. **Mol. Cel. Probes.**, v.15, p. 21-25, 2001.

GULRAJANI, T. S.; BEVERIDGE, W. I. B. Studies on respiratory diseases of pigs.IV Transmission of infectious pneumonia and its differentiation from swine influenza. **J. Comp. Path. Ther.**, v. 61, p. 118-139, 1951.

HADDAD, P. R. A competitividade do agronegócio: estudo de cluster. In: CALDAS, R. de A. (Ed.). **Agronegócio brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade**. Brasília, DF: CNPq/ Embrapa, 1999. 263p.

HALBUR, P. G. Porcine respiratory disease. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998. **Proceedings...** Birmingham, UK, [Internacional Pig Veterinary Society], 1998. p 1-10.

HALLOY, D. J. et al. Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. **Toxicology**, v. 213, p.34-44, 2005.

HAMILTON, T. D. C.; ROE, J. M.; WEBSTER, A. J. F. Synergistic role of gaseous ammonia in etiology of *Pasteurella multocida* induced atrophic rhinitis in swine. **J. Clin. Microbiol.**, 34, p. 2185-2190, 1996.

HARASAWA, R.; CASSELL, G. H. Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.46, p. 827-829, 1996.

HARMS, P. A.; HALBUR, P. G.; SORDEN, S. D. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. **J. Swine Health Prod.**, v.10, p. 27-30, 2002.

HERDTAN DER, M., et al. Genetic diversity and evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae* strain from Eastern Africa assessed by 16S rDNA sequence analysis. **Vet. Microbiol.**, v.78, p. 13-28, 2001.

HERRMANN, R. Genome structure and organization. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington, American Society for Microbiology, 1992. p. 157-168.

HILL, J. R.; JONES, T. An investigation of the causes and of the financial loss of rejection of pig carcasses and viscera unfit for human consumption. II. Studies at seven abattoirs. **Br. Vet. J.**, v. 140, n. 6, p. 558-569, 1984.

HILL, M. A. et al. Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 12, p. 2221-2223, 1992.

HUANG, S. et al. Mycoplasma infections and different human carcinomas. **World. J. Gastroenterol.**, v. 7, n. 2, p. 266-269, 2001.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2003**: efetivo de suínos por região. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil>>. Acesso em: 20 out. 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2003**: efetivo de suínos por região. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil>>. Acesso em: 20 out. 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Prod. Pec. Munic.**, v. 35, p.1-62, 2008.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

JASPER, D. E. Mycoplasma: their role in bovine disease. **J. Am. Vet. Ass.**, v. 151, p. 1650-1655, 1967.

JENSEN, J. S.; BORRE, M. B.; DOHN, B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p.261-266, 2003.

JOHANSSON, K. E.; HELDTANDER, M.; PETTERSSON, B. Characterization of mycoplasma by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. In: MILLES, R.; NICHOLAS, R. A. J. (Ed.). **Methods in molecular biology, mycoplasma protocols, humana**. Totowa: Press Inc., 1998. p. 145-165.

JOHANSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of *Mollicutes*. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 1-29.

KAWASHIMA, K.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. **J. Vet. Diag. Invest.**, 2007, v.19, p. 60-68.

KAZAMA, S. et al. Isolation of *M. hyorhinis* and *M. arginini* from the ears of pigs with otitis media. **Res. Vet. Sci.**, v.56, p. 108-110, 1994.

KESWANI, K.; WHITMAN, W. B. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 667-678, 2001.

KICH, J. D.; PONTES, P. A. **Análise da situação atual das doenças respiratórias no Brasil**. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/abraves-sc/pdf/Palestras2001/Jalusa_D_Kich.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2008.

KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Vet. J.**, v. 166, p. 251-256, 2003.

KING, K. W.; DYBVIG, K. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pKMK1. **Plasmid**, v.31, p.49-59, 1994.

KING, K. W.; DYBVIG, K. Nucleotide sequence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* plasmid pKMK1. **Plasmid**, v.28, p.86-91, 1992.

KOBAYASHI, H.; MOROZUMI, T.; MIYAMOTO, C. *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). **J. Vet. Med. Sci.**, v. 58, p. 109-113, 1996.

KOBE, K. Die aethiologie der Ferkelgrippe (Enzootische Pneumonia dês Ferkels). **Zbl. Bkt. Orig.**, v. 129, p. 161 (1933).

KOBISCH, M. Doenças respiratórias em suínos: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente da pneumonia enzoótica. **A Hora Veterinária**, Ano 17, n. 99, 1997.

KOBISCH, M. Mycoplasma diseases in pigs – Old diseases still causing trouble. In: THE 16TH INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, Melbourne, Austrália, **Anais....**, Melbourne:PVSG, 2000. p. 434-438.

KOBISCH, M.; FRIIS, N. F. Swine mycoplasmoses. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v.15, p.1569-1605, 1996.

KOELEMAN, J. G. M. et al.. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2522-2529, 1998.

KOKOTOVIC, B.; FRIIS, F.; AHRENS, P. Characterization of *Mycoplasma hyosynoviae* strains by amplified fragment length polymorphism analysis, pulsed-field gel electrophoresis and 16S ribosomal DNA sequencing. **J. Vet. Med. B.**, v.49, p.245-252, 2002.

KÖNIGSSON, M. H.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. **Vet. Microbiol.**, v. 85, p. 209-220, 2002.

LABARÉRE, J. DNA replication and repair. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and**

pathogenesis. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992. p. 309-323.

LANNEK N.; WESSLEN T, KIKAS E. Histological examinations of tissue cultures inoculated with cytopathogenic agent from swine enzootic pneumonia. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 36, n. 4, p.343-351,1955.

LAUERMAN, L. H.; HOERR, F. J.; SHARPTON, S.; SHAH, M.; VANSANTEN, V. L. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Dis.**, v.37, p.827–834. 1994.

LEITE et al. Comportamento de suínos submetidos a diferentes sistemas de pastejo em pastagem de Trevo Branco (*Trifolium repens* L.). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, p.1774-1779, 2006.

LIDDELL, S.; BAILEY, D.V. Market opportunities and threats to the U.S. pork industry posed by traceability systems. **Int. Food Agribusiness Rev.**, v.4, p.287-302, 2001.

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

LIPP, N. et al. Stimulation and prevention of retrovirus-specific reactions by mycoplasmas. **Med. Microbiol. Immun.**, v. 167, p. 127-136, 1979.

LIPUMA, J. J. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.17, p.667–675, 1998.

LO, S. C. et al. *Mycoplasma penetrans* sp. nov. from urogenital tract of patients with AIDS. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 357-364, 1992.

LUDWIG, W.; KLENK, H. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics, In: **BERGEY'S manual of systematics bacteriology**. 2. ed. Berlin: Springer Verlag, 2001. p. 49-65.

MAES, D. et al. Effect of vaccination against *Mycoplasma agalactiae* in pig herds with an all-in/all-out production system. **Vaccine**, v. 17, p.1024-1034, 1999.

MAES, D.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Enzootic pneumonia in pigs. **Vet. Quart.**, v.18, n.3, p.104-109, 1996.

MAHONY, J. B. et al. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* in first-void urine Specimens by multiplex polymerase chain reaction. **Mol. Diagn.**, v. 2, p. 161-168, 1997.

MANILOFF, J. Evolution of wall-less prokaryotes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 37, p.477-499, 1983.

MANILOFF, J. Phylogeny and evolution. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 31-43.

MANILOFF, J. Phylogeny of mycoplasmas. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington, American Society for Microbiology, 1992. P. 549-559.

MARE, C. J.; SWITZER, W. P. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. **Vet. Med. Small. Anim. Clin.**, v. 60, p. 841–846, 1965.

MARIANTE, A. S. et al. Pig biodiversity in Brazil, **Arch. Zootec.**, v. 52, p. 245-248, 2003.

MAROIS, C.; DUFOUR-GESBERT, F.; KEMPH, I. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. **Vet. Microbiol.**, v. 79, p.1-9, 2001.

MAROIS, C.; LE CARROU, J.; KOBISH, M. GAUTIER-BOUCHARDON, A.V. et al. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Vet. Microbiol.**, v. 120, p. 96-104, 2007.

MARTÍNEZ, J. et al. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. **Vet. J.**, v. 174, p. 160-164, 2007.

MATTSSON, J.G. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. **Mol. Cell. Probes**, v. 33, p. 893-897, 1995.

McGARRITY, G. J.; KOTANI, H. Cell culture mycoplasma In: RAZIN, S.; BARRILE, M. F. (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1985. v.4, p. 353-390.

MCLAUCHLIN, J. et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MEGIDO, J. L. T.; XAVIER, C. Marketing e Agribusiness. São Paulo: Atlas, 1998. p.36-39.

METTIFOGO, Elena. **Micoplasma de origem aviária :Diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase multiplex tipificação genômica com primers arbitrários e eletroforese de campo pulsado de cepas de *Mycoplasma gallisepticum***. 2003. 194 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEYLING, A. *Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma hyorhinis* demonstrated in pneumonic pig lungs by the fluorescent antibody technique. **Acta Vet. Scand.**, v.12, p. 137-141, 1971.

MEYLING, A.; FRIIS, N. F. Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. **Acta Vet. Scand.**, v. 13, p. 287-289, 1972.

MIELE, M.; WAQUIL, P. D. Cadeia produtiva da carne suína no Brasil. **Rev. Pol. Agríc.**, v. 16, p. 75-87, 2007.

MILES, R. J. Cell nutrition and growth. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992, p. 23-40.

MINION, F. C. et al. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3056-3060, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) **Novos Tempos – A agropecuária no Brasil 2003 – 2006**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 24 dez. 2008.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PERREIRA, S. F.; KRISTINSSON, K. G.; WESTH, H.; JARLOV, J. O. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 430-438, 2002.

MIYASHITA, N.; SAITO, A.; KOHNO, S.; YAMAGUCHI, K.; WATANABE, A.; ODA, A.; KUZUYAMA, Y.; MATSUSHIMA, T. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. **Respir. Med.**, v. 98, p. 542-550, 2004.

MORES, M. A. Z. **Anatomopatologia e bacteriologia de lesões pulmonares responsáveis por condenações de carcaças em suínos**. 2006, 90 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MORÉS, N. **Estudos ecopatológicos na prevenção de doenças multifatoriais em suínos**. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abaves-sc/pdf/Memorias2000/4_Mores.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2009.

MORÉS, N. et al. Estimativa dos índices de pneumonia (IPP) e de rinite atrófica (IRA), através dos exames clínicos de tosse e espirro, respectivamente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999. **Anais...** 1999. Belo Horizonte: ABRAVES, 1999. p.173-174.

MORES, N.; ZANELLA, J. R. C. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/matler.asp?newsId=3402>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

MORETTI-BRANCHINI, M. L. et al. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel eletrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, p. 275-281, 1993.

MORITA, T. et al. Intranasally inoculated *Mycoplasma hyorhinis* causes eustachitis in pigs. **Vet. Patol.**, v. 36, p. 174-178, 1999.

MOSER, S. A.; MAYFIELD, C. A.; DUFFY, L. B.; WAITES, K. B. Genotypic characterization of *Ureaplasma* species by pulsed field gel electrophoresis. **J. Microbiol. Methods**, v. 67, p. 606-610, 2006.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K. R.; Tait, R. C. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Dis.**, v.35, p.62-69, 1991.

NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M.I. *Mycoplasma gallisepticum* F–vaccine strain-specific Polymerase Chain Reaction. **Avian Dis.**, v.37, p. 2023-2211, 1993.

NICOLSON, G. L.; NASRALIA, M. Y.; NICOLSON, N. L. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infectious. **Antimicrob. Infect. Dis. News**, v. 17, n. 11, p. 81-88, 1999.

NISHIGAWA, H., et al. A plasmid from a noninsect- transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. **Gene**, v. 298, 195–201, 2002.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M. O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 15-26.

OLIVEIRA, R. C. **Utilização de estirpe local na prova de soroaglutinação microscópica para leptospirose canina**. 2003, 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

OLIVEIRA, R. C., **Isolamento de ureplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA**. 2008, 138 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OLSON, L. D.; RENSHAW, C. A.; ROTTEM, S.; BOAL, J. H. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism ¹³C-NMR study. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, p. 47-52, 1993.

PAGLIARINI, R. L. et al., **Utilização de proteínas transmembrana de *Mycoplasma hyopneumoniae* para sorodiagnóstico da pneumonia enzoótica suína.** Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R039-3.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

PALZER, A. et al. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. **Vet. Rec.**, v.162, p.267-271, 2008.

PANG, Y. et al. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. **Avian Dis.**, v. 46, p. 691-699, 2002.

PETTERSSON, B., et al. Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae* strains, based on polymorphis in the 16S rRNA genes. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 2350-2358, 1998.

PIFFER, I A. Doenças respiratórias: aspectos clínicos e controle. In: SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA, 1., 1997. **Anais...** Local: ABRAVES, 1997. p. 70.

PIFFER, I. A. ; BRITO, J. R. F. **Pneumonia em suínos.** Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 12p. (EMBRAPA-CNPSA. Documento, 23). **Ano II – No 8 – Junho/1993 – Periódico técnico-informativo elaborado pela EMBRAPA–CNPSA** Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/sudi008.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2008.

PIFFER, I. A. **Pneumonia enzoótica dos suínos.** Concórdia: EMBRAPA – CNPSA, 1983. (EMBRAPA – CNPSA, Circular Técnica, p. 23).

PIFFER, I. A.; BRITO, J. R. F. **Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos.** Concórdia – SC: EMBRAPA-CNPSA, 1991. 12 p. (EMBRAPA-CNPSA, Documento, 23).

PIJOAN, C. A. Neumonia enzootica de los cerdos. **Cienc. Vet.**, v. 1, p. 56-73,1976

PIZZOLATTI, I. J. **Agribusiness.** 2004. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/C84FADCED2D0109E03256F0E00788FA6/\\$File/NT0009853A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/C84FADCED2D0109E03256F0E00788FA6/$File/NT0009853A.pdf)>. Acesso em: 22 dez. 2008.

PRIKAZSKY, M. Endemic pneumonia in pigs and Mycoplasma. **Point Vet.**, v.20, p.137-148, 1988.

RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). **Microbiol. Rev.**, p.419-455, 1985.

RAZIN, S. Molecular properties of *Mollicutes*: a synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. California: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-40.

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S. Mycoplasmas: General concepts. **Med. Microbiol.**, 2004. Disponível em: <<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>>. Acesso em: 14 Mar. 2005.

RAZIN, S. The genus mycoplasma and related genera (Class Mollicutes) In: DWORKIN, M; FALKOWS; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKBRANT, (Ed.). **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. 3. ed. New York: Springer, 2006. p. 836-904.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 572 p.

RAZIN, S.; HYMAN, H. C.; WOGUE, D. DNA probes for detection and identification of mycoplasma (MOLLICUTES). **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, p. 735-741, 1987.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Mycoplasma characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983. v. 1, 504 p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 63, p. 1094-1156, 1998.

RIBEIRO, F. C.; SILVA, J. C. P.; SANTOS, J. L.; PONTES, K C S. Diagnóstico da pneumonia enzoótica suína pela técnica da imunoperoxidase. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 6, p. 709-714, 2004.

ROCOURT, J. et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 263-67, 2003.

RODWELL, A. W.; PETERSON, J. E.; RODWELL, E. S. Macromolecular synthesis and growth of mycoplasmas. **Excerpta Med.**, p.123-139, 1972.

ROPPE, L. A suinocultura em números. **Suinocultura Industrial**, Porto Feliz, SP, v.10, n. 120, p.24-34, 1996.

ROSENGARTEN, R. et al. Antigenic variation in *Mycoplasma hyorhinis*: Increased repertoire of variable lipoproteins expanding surface diversity and structural complexity. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 5, p. 2224-2228, 1993.

ROSS, R. F. Mycoplasma – animal pathogens. In: KAHANE, I.; ADONE, A. (Ed.). **Rapid diagnosis of mycoplasmas**. New York: Plenum Press, 1993. p. 69-109.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases, In: LEMAN, A. D.; STRAW, B. G.; GLOCK, R.D.; MENGELING, W. L.; PENNY, R. H. C.; SCHOLL, E. (Ed.). **Diseases of Swine**. 6. ed. Ames:Iowa State University Press, 1986. p. 469-483.

ROSS, R. F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B., et al. **Disease of swine**. 8. ed. Iowa: Iowa State University, 1999. p. 495-509.

ROSS, R. F. Pneumonia micoplásmica suína. **Hora Vet.**, v. 11, n. 61, p. 15-19, 1991.

ROSS, R. F.; SWITZER, W. P.; DUNCAN, J. R. Experimental production of *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, p. 1743-1749, 1971.

ROSS, R. F.; DUNCAN, J. R. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 157, p. 1515-1518, 1970

ROSS, R. F.; WHITTLESTONE, P. Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. **Methods in Mycoplasmaology**: diagnostic mycoplasmaology. New York: Academic Press, 1983. v.2, p. 115-127.

ROSSELLO-MORA, R. Updating Prokaryotic Taxonomy. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 6255-6357, 2005.

ROTTEM S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 417-432, 2003.

SADER, H. S. et al. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo using pulsed-field gel eletrophoresis of chromosomal DNA. **Infect. Hosp. Epidemiol.**, v. 15, p. 320-323, 1994.

SAHU, S. P.; YEDLOUTSCHNIG, R. J. Contagious bovine peluropneumonia. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.). **Mycoplasmosis in Animals**: laboratory diagnosis. Ames: Iowa State University Press, 1994. p. 39-50.

SANTINI, G. A.; SOUZA FILHO, H. M. Mudanças tecnológicas em cadeias agroindustriais: uma análise dos elos de processamento da pecuária de corte, avicultura de corte e suinocultura In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA RURAL, 42., 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: SOBER, 2004. p.1-12

SANTOS, B. P. **Caracterização físico-química e sensorial dos apresetados elaborados com carne suína provenientes da raça JRS, e acrescidos dos hidrocolóides: carragena, fécula de mandica e maltodextrina**. 2005, 95 f.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SARTOR, V.; SOUZA, C.F.; TINOCO, I.F.F. Informações básicas para projetos de construções rurais (Unidade 2): Instalação para suíno. **Construções rurais e Ambiência (DEA-UFV)**, p. 1-18, 2004. Disponível em: <www.ufv.br/dea/ambiagro/arquivos/suínos.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2009.

SCHMIDT, J. A. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* P65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. **J. Bact.**, v. 186, p. 5790-5798, 2004.

SCHULMAN, A.; ESTOLA, T., Experimental transmission of SEP agent in swine. **Zbl. Vet. Med. B.**, v.13, p. 650-659, 1966.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. - Separation of yeast chromossome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electroforesis. **Cell**, v. 3, p. 67-75, 1984.

SCHWARTZ, K. J. **O papel do *Mycoplasma hyopneumoniae* no complexo de doenças respiratórias dos suínos.** In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL PFIZER DE PNEUMONIA ENZOÓTICA, 1., Campinas, 2001. **Anais...** Local: PFIZER, 2001. p. 23-40.

SCOFANO, A.S. **Pneumonia Enzoótica suína: diagnóstico anatomopatológico, prevalência e efeitos sobre o desenvolvimento de carcaça.** 2006, 51 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Estudos de mercado SEBRAE/ESPM 2008.** Suinocultura - carne *in natura*, embutidos e defumados. Publicado 08/10/2008. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/940D00C95AF52E6D832574DC004C0C3B/\\$File/NT000390AA.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/940D00C95AF52E6D832574DC004C0C3B/$File/NT000390AA.pdf)>. Acesso em: 17 dez. 2008.

SHELDRAKE, L. F, et al. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by ELISA after experimental and natural infection of pigs. **Aust. Vet. J.**, v.67, p.39-42, 1990.

SHOPE, R. E. Swine influenza III. Filtration experiments and etiology. **J. Exp. Med.**, v. 54, p.349-359, 1931.

SILVA FILHA, O. L. et al. Caracterização da criação de suínos locais em sistema de utilização tradicional do estado do Paraíba, Brasil. **Arch. Zootec.**,v. 54, p. 206-207, 2005.

SILVA, A. F. et al. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brasil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY,

17., 2002, Ames, Iowa, USA **Proceedings...** Ames, Iowa, USA: International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), v. 2. 2002. p. 332.

SILVA, A. F. **Gerenciamento e controle das doenças respiratórias dos suínos.** Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Palestras2001/Amilton_Ferreira_da_Silva.pdf>. Acesso em: 20 out. 2008.

SIMECKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E; STÄDTLANDER, C. T. K-H.; CASSEL, G. H. *Mycoplasma* Diseases of Animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis.** Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3-22.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Clínica e patologia suína.** 2. ed. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 1999. 464 p.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Pneumonia Enzoótica Suína.** Goiânia: Art 3 impressos especiais, 2001a. 44 p.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. Pneumonia Enzoótica. **Clinica e Patologia Suína.** Concórdia: Art 3 impressos, 1994. p. 214-218.

SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. A.; FREITAS, A. R. **Impacto de doenças respiratórias dos suínos nos sistemas de produção do Estado de Santa Catarina.** Concórdia, Santa Catarina: EMBRAPA-CNPISA, 1987. 5 p. (EMBRAPA-CNPISA, Comunicado Técnico, 123).

SONCINI, R. Critérios para adoção de vacinas autógenas na suinocultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRATES, 2007. p. 68-72.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int. J. Syst. Bact.**, v.44, p.846-849, 1994.

STAHL, D. A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WATER, M. W. (Ed.). *Manual of environmental microbiology.* Washington: ASM Press, 1997, p. 102-114.

STAKENBORG, T. Identification of mollicutes and characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. 167 f. Ph. D. Thesis - Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, 2005.

STÄRK, K. D. C. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine – A literature review. **Vet. J.**, v.159, p.37-56, 2000.

STELLRECHT, K. A.; WORON, A. M.; MISHRIK, N. G.; VENEZIA, R. A. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasma. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p. 11528-1533, 2004.

STEMKE, G. W. A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the aetiological agent of enzootic pneumonia. **Mol. Cell. Probes**, v.3, p. 225-232, 1989.

STEMKE, G. W., et al. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare* and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gen sequence. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p. 81-84, 1994.

STEVENSON, W. Bacterial pneumonia in swine. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 15., 1998. **Proceedings...** Ames: Birmingham, International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), 1998. p. 11-20.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro em condições tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de stress térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19., 1997. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p.40.

STRUELENS, M. J.; RYCK, R. D.; DEPLANO, A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER K. J.; STRUELENS, M. (Ed.). **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. London: Elsevier, 2001. p.159-176.

SWITZER, W. P. Studies on infectious atrophic rhinitis of swine, I. isolation of a filterable agent from the nasal cavity of swine with infectious atrophic rhinitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.123, n. 916, p. 45-47, 1953.

SWITZER, W. P. Swine mycoplasmas. **J. Am. Vet. Assoc.**, v. 151, p. 1656-1661, 1967.

TALAMINI, E.; FERREIRA, G. M. V. **Mercado internacional da carne suína:** variáveis que influenciam no número de países importadores (Texto para discussão, n. 03/2006). Disponível em:<http://www.upf.br/cepeac/download/td_03_2006.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2008.

TAMBIC, A.; POWER, E. G. M.; TAMBIC, T.; SNUR, I.; FRENCH, G. L. Epidemiological analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using a randomly Amplified Polymorphic DNA- typing method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 335-340, 1999.

TANG, Y. W.; POCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostic of infectious diseases. **ACTA Vet. Hung.**, v.43, n.11, p.2021-2038, 1997.

TAYLOR, J. D. The Lungs. In: SIMS, L.D., GLASTONBURY, J.R.W. (Ed.). **Patology of the pig**. A Diagnostic guide. Barton: The pig research and development corporation, 1996. cap. 14, p. 219-238.

TAYLOR-ROBINSON, D. et al. Urogenital mycoplasma infections of man: A review with observations on a recently discovered mycoplasma. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 17, p. 524-530, 1981.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; GOERING, R. V. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. 6, p. 426- 439, 1997.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 5, p.317-320, 2004.

THACKER, E. L. et al. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) - induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Vaccine**, v.18, p. 1244-1252, 2000.

THACKER, E. L. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n.3, p. 620-627, 1999.

THACKER, E. L. Immunology of the porcine respiratory disease complex. **Vet. Clin. North. Am.**, v.17, p. 551-565, 2001.

THANAWONGNUWECH, R. et al. Increased production of proinflammatory following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v.11, n. 5, p.901-908, 2004.

THOMPSON, F. L et al. **Taxonomia:** Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Ciência, Tecnologia e Inovação. Disponível em: <www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752>. Acesso em: 08 de jan. de 2009.

TIMENETSKY, J. **Micoplasmas:** animais de laboratório (ratos e camundongos) e culturas celulares. 2004, 221 f. Tese (Livre-Docência em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TIMENETSKY, J.; SANTOS, L. M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple micoplasma infection in cell cultures by PCR. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 39, p. 907-914, 2006.

TOLA, S. et al. comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 143, p. 259-265, 1996.

TULLY, J. G. Bacterial and fungal inhibitors in mycoplasma culture media. In.: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmology: Mycoplasma characterization**. New York: Academic Press, 1983. p. 205-209.

TULLY, J. G. et al. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.33, p. 387-396, 1983.

TULLY, J. G. et al. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*; proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod associated mollicutes to ordinal rank (*entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*entomoplasmataceae* fam. No.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the Order *Mycoplasmatales*, Family *Mycoplasmataceae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, n.2: p.378-85. 1993.

TULLY, J. G. Mollicutes-host-interrelationships: current concepts and diagnostic implications: In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmology**. California: Academic Press, 1996. v. 2, p. 1-21.

TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F. The genus *Spiroplasma*. In.: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p.1960-1980.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 28 abr. 2006.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR Analysis for Detection of *Mycoplasma* Infections in Continuous Cell Lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, v.38, n. 2, p. 79-85, 2002.

USADA - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov>> Acesso em: 28 Abril 2006.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VAZQUEZ- BOLAND J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p. 584-640, 2001.

VEENHUIZEN, M. F. Três patógenos bacterianos no complexo doença respiratória dos suínos. **Swine Med.**, v. 20, n. 1, p. 11-18, 1998.

VERDIN, E. et al. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. **Vet. Microbiol.**, v.76, p.31-40, 2000.

VESSALIC, J. et al. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. **Arch. Pathol. Lab. Méd.**, v. 117, p. 1088-1098, 1993.

VIANEZ JÚNIOR, J. L. S. G. **Avaliação criteriosa das seqüências dos genes *rrn*, *rpoB* e *gyrB* como ferramentas em taxonomia microbiana**. 2005, 73 f. Dissertação (Bacharel em Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

VICCA, J. et al. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 177-190, 2003.

VIELMO, H. **Dejeto líquido de suínos na adubação de pastagem de tifton 85**. 2008, 94 f. Doutorado (Tese em Produção Vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VOELKER, L. L.; DYBVIG, K. Characterization of the lysogenic bacteriophage MAV1 from *Mycoplasma arthritidis*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5928-5931, 1998.

VOELKER, L. L.; DYBVIG, K. Sequence analysis of the *Mycoplasma arthritidis* bacteriophage MAV1 genome identifies the putative virulence factor. **Gene**, v. 233, p.101-107, 1999.

VOS, P. et al. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 4407-4414, 1995.

WESSLÉS, T.; LANNEK, N. The isolation and cultivation in tissue cultures of a cytopathogenic agent from pigs with enzootic pneumonia (so-called Virus Pneumonia). **Nord. Vet. Med.**, v. 6, p.481, 1954.

WHITTLESTONE, P. Porcine mycoplasmas. In: TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F. (Ed.). **The mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1979. v 2, p. 133-176.

WOESE, C. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, n. 2, p. 221-71, 1987.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria and eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.87, p. 4576-4579, 1990.

WOESE, C. R.; STACKEBRANDT, E.; LDWIG, W. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. **J. Mol. Evol.**, v.21, p.305-316, 1985.

WU, C. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. **Vet. Microbiol.**, v. 76, p. 25-30, 2000.

YAMAGUTI, M. **Deteção do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela reação em cadeia da polimerase (Nested-PCR) em suínos com problemas respiratórios.** 2003, 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

YAMAGUTI, M. et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 471, 2008.

YAMAMOTO, R; KHAN, M. I; ZHAO, S; NASCIMENTO, E. R; CHARLTON, B. Molecular methods used for detecting and fingerprinting pathogenic avian mycoplasmas. In: DAVIS, C. A. (Ed.). **Poultry Mycoplasma workshop**, (Biotechnology), 1994. p. 1-19.

YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON-MCKOWN, R.; WISE, K. S. Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding region and 5' regulatory sequence. **Embo J.**, v. 10, p. 1069-1079, 1991.

ZHANG, Q.; YOUNG, T. F.; ROSS, R. F.: Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1013-1019, 1994.

ZIELINSKI, G. C. et al. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. **Am. J. Vet. Res.**, v. 51, n. 3, p. 339-343, 1990.

ZOU, N.; PARK, K.; DYBVIG, K. Mycoplasma virus P1 has a linear, double-stranded DNA genome with inverted terminal repeats. **Plasmid**, v.33, p.41-49,1995.

ZYDEK, E. J. **Rumos da Industrialização de suínos.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7., 1997, **Anais...** Foz do Iguaçu. Foz do Iguaçu: ABRATES, 1997. p. 60-62.

ANEXO A

Extração do DNA: Método sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM *et al.*,1990)

1. 200 μ l do meio de transporte que contem o suabe
2. Acrescentar 1000 μ L de tampão de lise e 40 μ l da suspensão carreadora
3. Agitar por 90 segundos. Deixar o microtubo na bancada por 10 minutos
4. Centrifugar a 10.000 x g durante 4 minutos
5. Desprezar o sobrenadante
6. Adicionar 500 μ L de tampão de lavagem
7. Agitar por 15 segundos
8. Centrifugar a 10.000 x g durante 90 segundos
9. Desprezar sobrenadante
10. Repetir as etapas 6, 7, 8 e 9
11. Adicionar 1.000 μ L de etanol 70%
12. Repetir as etapas 7, 8 e 9
13. Repetir as etapas 11 e 12
14. Adicionar 500 μ L de acetona PA
15. Secar o pellet em estufa à 37°C durante 20 minutos
16. Adicionar 150 μ L de tampão de eluição
17. Agitar por 60 segundos
18. Colocar em banho-maria à 56°C durante 10 minutos
19. Agitar durante 60 segundos
20. Centrifugar a 10.000 x g durante 5 minutos
21. Recolher o sobrenadante.

ANEXO A

Extração de DNA (BOOM et al., 1990)

Tampão de lise:

Guanidine Isotyocianate.....	120 gr
Triton 100x.....	1 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	8,8 mL
Tris-HCL 0,1 M (pH 6,4).....	111,2 mL

Tampão de lavagem:

Guanidine Isotyocianate.....	120 gr
Tris-HCL 0,1M (pH 6,4).....	100 mL

Solução carreadora:

Diatomaceous earth.....	1gr
Água.....	5 mL
HCL 37%.....	50 µl

ANEXO B

Meio Friis Modificado (FRIIS, 1971)

- PPLO (Difco®).....	3,30g
- BHI (Infusão Cérebro Coração).....	3,00g
- Sais de Hanks	0,20g
- H ₂ O deionizada.....	410,00 mL

O pH ajustado em 7,4

Autoclavar a 121°C por 15 min.

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro suíno (Invitrogen®).....	30 mL
- Extrato fresco de levedura 20%.....	5,0 mL
- Bacitracina (Sigma®) 0,5mg/ mL.....	0,68 mL
- Meticilina (Sigma) 0,5mg/mL.....	0,68 mL
- glicose 10%.....	0,4 mL
- Vermelho de Fenol 0,05% (Merck®).....	4 mL

-

Realizar o teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

		20		40		60		80		100		120														
03 Tonsila	ACGCTCGCTGTGTGCTAATACATGCATGTTGAACGGGATG												15													
10 Tonsila													14													
06 Tonsila													15													
172 Tonsila													14													
120 Nasal													12													
36 Pulmão													15													
35 Pulmão				T									12													
183 Tonsila													15													
174 Tonsila													11													
02 Tonsila													1													
1. hyorhinis													15													
67 Pulmão													14													
60 Pulmão													15													
08 Tonsila			T										15													
072 Nasal													14													
80 Pulmão													12													
83 Pulmão													15													
3 Traqueia													15													
017 Nasal													15													
. flocculare	A		T		AGTATTTTAGTTT	.CT	AGT	GTTTT		A			1													
009Tonsila	A		T		AGTATTTTAGTTT	.CT	AGT	GTTTT		A			1													
020 Nasal	A		T		AGTATTTTAGTTT	.CT	AGT	GTTTT		A			13													
vi hyopneu	A		T		A	A	TTTTAGTTC	GCT	A	T			12													
14 Pulmão	A		T		A	A	TTTTAGTTC	GCT	A	T			13													
		140		160		180		200		220		240	2													
03 Tonsila	TATTGGAAACAATAGCTAATACCGGATATAGTTATTTATCGCATGATGAGTAATAGAAAGGAGCTTCAC												2													
10 Tonsila													20													
06 Tonsila													23													
172 Tonsila													23													
120 Nasal													29													
36 Pulmão													2													
35 Pulmão													20													
183 Tonsila													29													
174 Tonsila													20													
02 Tonsila													29													
1. hyorhinis													27													
67 Pulmão													20													
60 Pulmão													27													
08 Tonsila													20													
072 Nasal													26													
80 Pulmão													2													
83 Pulmão													2													
3 Traqueia													28													
017 Nasal													27													
. flocculare	C		G	G		A	A	AAAT	A	ATTT	T	GA		GAA	ATA		C	CA		C		A	28			
009Tonsila	C		G	G		A	A	AAAT	AT	ATTT	T	GA		GAA	ATA		C	CA		C		A	28			
020 Nasal	C		G	G		CA	A	AAAT	AT	ATTT	T	GA		GAA	ATA		C	CA		C		AA	24			
vi hyopneu	C		G	G		GA	A	AAAT	T	ATTT	T	TC		T	CA		CA	G		C		AA	27			
014 Nasal	C		G	G		GA	A	AAAT	T	ATTT	T	TC		T	CA		CA	G		C		AA	24			
M. hyopneumoniae	TTTTGC		GAGAA	TGT	CAAGAG	TGGG	TAAAGG	TCT	ACGCGT	ATCA	TCAA	ATTAA	ACCACAT	GTCTCC	ACCG		CTTGTG	CGGGT	TCCCGT	CAATTC	CTTTA	AAGTTT	CACTCT	TG	CGAGCATA	587
14 pulmão	TTTTGC		GAGAA	TGT	CAAGAG	TGGG	TAAAGG	TCT	ACGCGT	ATCA	TCAA	ATTAA	ACCACAT	GTCTCC	ACCG		CTTGTG	CGGGT	TCCCGT	CAATTC	CTTTA	AAGTTT	CACTCT	TG	CGAGCATA	583

Anexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 1 a 228 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.

Continua

Continuação

		260		280		300		320		340		360		
I03 Tonsila	GCCTACCAAGACGATGATGTTTAGCCGGCCGAGAGGCTGTACGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCCACAATGAGCGAAAGCTTG													351
I10 Tonsila														351
I06 Tonsila														351
I72 Tonsila														351
120 Nasal														351
36 Pulmão														351
35 Pulmão														351
I83 Tonsila														351
I74 Tonsila														351
I02 Tonsila														351
I. hyorhinis														351
67 Pulmão														351
60 Pulmão														351
I08 Tonsila														351
072 Nasal	C.....													350
80 Pulmão														351
83 Pulmão														350
3 Traquéia										A.G				351
017 Nasal														351
. flocculare	G.....A.....T.....C.....T.....											A		369
009Tonsila	G.....A.....T.....C.....T.....											A		369
020 Nasal	G.....A.....T.....C.....T.....											A		369
VI hyopneu	G.....A.....T.....C.....T.....											A		359
14 Pulmão	G.....A.....T.....C.....T.....											A		359
		380		400		420		440		460		480		
I03 Tonsila	ATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGTTCCTTCGGAATGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAATAGAAATAGGAAATGATTTTATCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCGACGGCAAAC													474
I10 Tonsila														474
I06 Tonsila														474
I72 Tonsila														474
120 Nasal														474
36 Pulmão														474
35 Pulmão														474
I83 Tonsila														474
I74 Tonsila														474
I02 Tonsila														474
I. hyorhinis														474
67 Pulmão														474
60 Pulmão														474
I08 Tonsila														474
072 Nasal														473
80 Pulmão														474
83 Pulmão														473
3 Traquéia														474
017 Nasal														474
. flocculare	CT.A.T.....G.....TAGG.....G.....C.A.....C.....													492
009Tonsila	CT.A.T.....G.....TAGG.....C.A.....C.....													492
020 Nasal	CT.A.T.....G.....TAGG.....C.A.....C.....													492
VI hyopneu	CT.....G.....G.....CTAG.....C.C.AG.....													482
14 Pulmão	CT.....G.....													482

ANEXO C

Anexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 229 a 4742 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.

Continua

Continuação

	500	520	540	560	580	600	
03 Tonsila	TATGTGCCAGCAGCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTGTCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCT						597
10 Tonsila							597
06 Tonsila							597
72 Tonsila							597
120 Nasal							597
36 Pulmão							597
35 Pulmão							597
83 Tonsila							597
74 Tonsila							597
02 Tonsila							597
. hyorhinis							597
37 Pulmão							597
50 Pulmão							597
08 Tonsila							597
072 Nasal							596
30 Pulmão				C			597
33 Pulmão							596
3 Traquéia							597
017 Nasal							597
. flocculare				T		T	615
009Tonsila				T		T	615
020 Nasal				T		T	615
. hyopneu				T		T	605
14 Pulmão				T		T	605
	620	640	660	680	700	720	
03 Tonsila	TTGGATACTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATATATTGACACT						720
10 Tonsila							720
06 Tonsila							720
72 Tonsila							720
120 Nasal							720
36 Pulmão							720
35 Pulmão							720
83 Tonsila							720
74 Tonsila							720
02 Tonsila							720
. hyorhinis							720
37 Pulmão							720
50 Pulmão							720
08 Tonsila							720
072 Nasal							719
30 Pulmão							720
33 Pulmão							719
3 Traquéia							720
017 Nasal							720
. flocculare							738
009Tonsila							738
020 Nasal							738
. hyopneu							728
14 Pulmão							728

ANEXO C

Anexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 475 a 720 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.

Continua

Continuação

	500	520	540	560	580	600	
03 Tonsila	TATGTGCCAGCAGCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTGTCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCT						597
10 Tonsila							597
06 Tonsila							597
72 Tonsila							597
120 Nasal							597
36 Pulmão							597
35 Pulmão							597
83 Tonsila							597
74 Tonsila							597
02 Tonsila							597
. hyorhinis							597
37 Pulmão							597
50 Pulmão							597
08 Tonsila							597
072 Nasal							596
30 Pulmão				C			597
33 Pulmão							596
3 Traquéia							597
017 Nasal							597
. flocculare				T		T	615
009Tonsila				T		T	615
020 Nasal				T		T	615
/ hyopneu				T		T	605
14 Pulmão				T		T	605
	620	640	660	680	700	720	
03 Tonsila	TTGGATACTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCAATAGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATATATTGACACT						720
10 Tonsila							720
06 Tonsila							720
72 Tonsila							720
120 Nasal							720
36 Pulmão							720
35 Pulmão							720
83 Tonsila							720
74 Tonsila							720
02 Tonsila							720
. hyorhinis							720
37 Pulmão							720
50 Pulmão							720
08 Tonsila							720
072 Nasal							719
30 Pulmão							720
33 Pulmão							719
3 Traquéia							720
017 Nasal							720
. flocculare							738
009Tonsila							738
020 Nasal							738
/ hyopneu							728
14 Pulmão							728

Anexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 475 a 720 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.

Continua

Continuação

	740	760	780	800	820	840	860	
03 Tonsila	AAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAA	-	CAGGATTAGATACCC	TGGTAG	TCCACGCCGTAAACGATGATCATTAGTTGGTGGGAATAATT	TCACTAACGCAGCTAACCGCGTTAAATGATCCGCCTG		842
10 Tonsila								842
06 Tonsila			A					843
72 Tonsila								842
120 Nasal			C					843
36 Pulmão								842
35 Pulmão								842
83 Tonsila								842
74 Tonsila								842
02 Tonsila	.G.		C					843
. hyorhinis								842
67 Pulmão								842
60 Pulmão		GAGC	A					843
08 Tonsila								842
072 Nasal			C					842
80 Pulmão								842
83 Pulmão				CC				841
3 Traquéia				CC				842
017 Nasal								842
. flocculare	.G.		C		CC	G	G	860
009T tonsila	.G.		C		C	G	G	860
020 Nasal	G		C		C	G	G	859
A hyopneu			C		C	A	G	849
14 Pulmão			C				A	849
	880	900	920	940	960	980		
03 Tonsila	AGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTGAAG	C	TACGCGTAGAACCTTACCCACTCTTGACATCTTCTGCAAAAG					965
10 Tonsila								965
06 Tonsila								966
72 Tonsila				A				965
120 Nasal				A				966
36 Pulmão								965
35 Pulmão				T	T			965
83 Tonsila								965
74 Tonsila				A				965
02 Tonsila				G	A			966
. hyorhinis				A				965
67 Pulmão				A				965
60 Pulmão				A				966
08 Tonsila				T	T			965
072 Nasal				A				965
80 Pulmão				A				965
83 Pulmão								964
3 Traquéia				T	T			965
017 Nasal				TATG	T		G	965
. flocculare				A		TC	A	982
009T tonsila				A		TC	A	982
020 Nasal				T	A	TC	A	981
A hyopneu				T	A	TC	A	971
14 Pulmão				A		TC	A	971

ANEXO C

Anexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 721 a 965 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.

Continua

		1,000		1,020		1,040		1,060		1,080		1,100		
ila	C T A T A G A G A T A T A G T G G A G G T T A A C C A G A A T G A C A G A T G G T G C A T G G T T G T C G T C A G C T C G T G T C G T G A G A T G T T A G G T T A A G T C C T G C A A C G A G C G C A A C C C T T T T C T T A G T T A C T A A T A T T													1088
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1089
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1089
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1089
ris	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1089
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1087
éia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1088
are	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	1105
ila	.	C.	.	C.	.	GAG.	T	.	.	.	.	G	C.	1105
sal	.	C.	.	C.	.	GAG.	T	.	.	.	.	G	C.	1104
eu	.	CC	.	C	.	GAG.	C	.	.	.	.	G	C.	1094
ão	.	CC	.	C	.	GAG.	C	.	.	.	.	G	C.	1094
		1,120		1,140		1,160		1,180		1,200		1,220		
ila	A A G T T A A G G A C T C T A G A G A T A C T G C C T G G G T A A C C A G G A G G T G G G G A C G A C G T C A A A T C A T C A T G C C T C T T A C G A G T G G G G C A A C A C A C G T G C T A C A A T G G T C G G T A C A A G A G A A G C A													1211
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1212
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1212
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1212
ris	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1212
ila	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
ão	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1210
éia	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
sal	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1211
are	.	G	A	C	.	.	G	T	.	A	C	.	T	1228
ila	.	G	A	C	.	.	G	T	.	A	C	.	T	1228
sal	.	G	A	C	.	.	G	T	.	A	C	.	T	1227
eu	T	G	A	C	A	.	G	C	C	G	C	.	.	1217
ão	T	G	A	C	A	.	G	C	C	G	C	.	.	1217

Continua

Continuação

	1.240	1.260	1.280	1.300	1.320	1.340	
03 Tonsila	ATATGGTGACATGGAGCAAATCTCAAAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTTC						1334
10 Tonsila							1334
06 Tonsila							1335
72 Tonsila							1334
120 Nasal							1335
36 Pulmão							1334
35 Pulmão							1334
83 Tonsila							1334
74 Tonsila							1334
02 Tonsila							1335
l. hyorhinis							1334
67 Pulmão							1334
60 Pulmão							1335
08 Tonsila							1334
072 Nasal							1334
80 Pulmão							1334
83 Pulmão							1333
3 Traquéia							1334
017 Nasal							1334
. flocculare	.A.CA..TG.CA..T..GTAG..C.G..TA.G..						1351
009Tonsila	.A.CA..TG.CA..T..GTAG..C.G..TA.G..						1351
020 Nasal	.A.CA..TG.CA..T..GTAG..C.G..TA.G..						1350
il hvoooneu	.A.CA..TG.CA..T..GTAG..C.G..TA.G..						1340
114Pulmão	.A.CA..TG.CA..T..GTAG..C.G..TA.G..						1340
	1.360	1.380	1.400	1.420	1.440		
03 Tonsila	TCGGGTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTAATGCCCAAAGTCGGTGAGTAACCTCGGAGACCATGCCTAAGGCAGACTGATGACT						1432
10 Tonsila							1432
06 Tonsila							1433
72 Tonsila							1432
120 Nasal							1433
36 Pulmão							1433
35 Pulmão							1432
83 Tonsila							1433
74 Tonsila							1432
02 Tonsila							1433
l. hyorhinis							1432
67 Pulmão							1433
60 Pulmão							1433
08 Tonsila							1432
072 Nasal							1433
80 Pulmão							1432
83 Pulmão							1432
3 Traquéia							1432
017 Nasal							1432
. flocculare							1449
009Tonsila							1450
020 Nasal							1448
il hvoooneu							1438
114Pulmão							1437

nexo C - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos obtidos dos produtos da PCR com “primers” R16S, F16S, RCO3 e RCO4, referente às posições 1212 a 1432 do gene 16S rRNA das cepas e isolados de micoplasmas.