

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR  
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Kist Traesel

**Ricardo Junio Werneck Dias Ruas**

Uruguaiana, junho de 2018

**RICARDO JUNIO WERNECK DIAS RUAS**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM  
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Kist Traesel

**Uruguaiana  
2018**

## **RICARDO JUNIO WERNECK DIAS RUAS**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Sanidade de suínos

Relatório apresentado e defendido em 18 de junho de 2018.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Kist Traesel  
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Irina Lubeck  
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Bruno Leite dos Anjos  
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico esse trabalho, resultado de lutas diárias durante anos, aos meus tão amados pais, Geísa e Ricardo, e às minhas irmãs Rayane e Ruane.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter sonhado este sonho pra mim, por me dar condições de suportar cada dia que se passou e por ter colocado tantos amigos no meu caminho.

Também preciso dizer meu muito obrigado aos meus queridos pais Ricardo e Geísa. Sei que não imagino um décimo do que fizeram para que eu pudesse ter uma profissão, mas tenham certeza que esta pequena parte, onde entendo o que fizeram por mim, é o suficiente pra que eu sinta a mais pura e sincera gratidão. Agradeço a minhas irmãs, Ruane e Rayane, mesmo que distantes, sempre se fizeram presentes, cada uma de sua forma, porém sempre pude sentir o carinho e cuidado em cada palavra.

Obrigado aos irmãos que ganhei em Uruguaiana. Chico, Edu, Guigão e Lannes, muito obrigado por cada dia em que pudemos aprender, crescer e melhorar como pessoa. Obrigado pelas histórias que ficarão guardadas em nossas memórias. Ao Ranchinho, meu mais profundo respeito! Leonardo Marques, tu é o cara mais sensacional que eu tive o prazer de conhecer e também te carrego no peito não só como uma agregado do Ranchinho, mas um irmão.

Gabriella Dinarte, muito obrigado por todos estes anos de amizade verdadeira, de parceria e carinho. Pude aprender muito contigo, e posso dizer que o tamanho do teu coração me encanta. Me espelho em você pra ser uma pessoa melhor. Muito obrigado!

Agradeço aos professores por cada conversa fora da sala de aula, pelas rodas de bate papo onde pudemos ver o quão realmente vocês são ensinadores, o quanto vocês se preocupavam com o profissional que estaria se formando. Aos professores Mario Brum e Tiago Gallina, agradeço por toda atenção e ajuda no momento em que mais precisei na faculdade. A preocupação que demonstram com a formação do homem e não só com a do profissional, evidencia que são verdadeiros educadores. Professora Carolina Traesel, muito obrigado por ter aceitado o desafio de me orientar, saiba que serei eternamente grato.

“Não ganhe o mundo e perca sua alma;  
sabedoria é melhor que prata e ouro.”

**Bob Marley**

## **ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE SANIDADE DE SUÍNOS**

Este relatório visa descrever as atividades realizadas e acompanhadas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), na área de Sanidade de Suínos no Laboratório de Pesquisa em Suínos (LabSui), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), localizada na cidade de Jaboticabal no Estado de São Paulo. O Labsui foi o local de escolha para a realização do ECSMV, devido a sua importância e destaque na pesquisa em doenças dos suínos, sendo um centro de referência no Brasil. O estágio ocorreu durante o período de 19 de Fevereiro de 2018 a 10 de Maio de 2018, sendo totalizadas 450 horas. O estágio foi realizado sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Kist Traesel e supervisão do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira. Durante o estágio, foi possível realizar e acompanhar as atividades inerentes a dois projetos: 1) Atuação do vírus da diarreia viral bovina na via reprodutiva de machos suínos; 2) Caracterização da prevalência de *Mycoplasma suis* em amostras sanguíneas coletadas de matrizes de descarte no Estado de Santa Catarina. As atividades foram desenvolvidas de acordo com os afazeres dos alunos de pós-graduação do Labsui. Dessa forma, foi possível participar de coleta, processamento, análise e infecção de sêmen suíno; detecção de cio e inseminação artificial em porcas; e extração de DNA a partir de amostras de sangue, entre outras atividades. Conclui-se que o ECSMV foi de extrema importância para que o aluno se transforme em um profissional preparado para o mercado de trabalho.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Entrada do prédio administrativo da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, no campus Jaboticabal, durante realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Fonte: Google imagens (<http://www.101fm.com.br/101/camara-realiza-sessao-solene-na-unesp/>)..... 13
- FIGURA 2 - A: Placa na entrada do Laboratório de Pesquisa em Suínos. B: Sala destinada à realização de práticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal. .... 14
- FIGURA 3 - A: Baia de gestação e parição com escamoteador. B: Visão geral do galpão onde ficam as baias de gestação e as baias de creche à direita no Laboratório de Pesquisa em Suínos na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal..... 15
- FIGURA 4 - Laboratório de microbiologia anexo ao Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal, utilizado para conservação sanguínea e diluição de sêmen..... 17
- FIGURA 5 - Verificação de estro (A) e coleta de sêmen (B) em suínos pertencentes a projeto desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal..... 22
- FIGURA 6 - Fases de uma extração de DNA realizada durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal. A: desenho esquemático mostrando a separação do material genético da parte orgânica da amostra logo após primeira reação e centrifugação. Fonte: GENE TARGET SOLUTIONS; B: amostra logo após segunda centrifugação, evidenciando a separação do material genético na parte superior seguido da membrana de restos celulares e clorofórmio mais a baixo; C: agrupamento dos ácidos nucleicos presentes na solução logo após o processo overnight; D: pelete contendo DNA formado no fundo do microtubo pronto para a eluição e congelamento. .... 26



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Unesp – Jaboticabal. .... 18
- TABELA 2 - Relação de fêmeas suínas inseminadas e infectadas, ou não, de acordo com grupo e volume de suspensão viral inoculada durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Unesp – Jaboticabal. .... 23

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO .....	11
2 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	12
2.1 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp - Jaboticabal) .....	12
2.1.1 Estrutura física do Laboratório de Pesquisa em Suínos .....	13
2.1.2 Laboratório destinado ao processamento de sêmen e sangue .....	16
2.2 Descrição das atividades acompanhadas durante o ECSMV no Labsui/Unesp – Jaboticabal .....	17
2.2.1 Projeto BVDV.....	19
2.2.1.1 Coleta e processamento das amostras sanguíneas.....	19
2.2.1.2 Coleta e processamento do sêmen .....	20
2.2.1.3 Inseminação artificial intra-cervical .....	21
2.2.2 Projeto <i>Mycoplasma suis</i> .....	24
2.2.2.1 Extração de DNA .....	24
2.2.3 Visita técnica .....	27
3 – DISCUSSÃO .....	28
3.1 BVDV     28	
3.2 <i>Mycoplasma suis</i> .....	30
4 – CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO        40	

## 1 – INTRODUÇÃO

Com a constante popularização da carne suína e crescente aumento da demanda, a suinocultura está assumindo, cada dia mais, um papel importante na economia mundial. A produção mundial de carne suína, atingiu em 2017 o total de 111 milhões de toneladas produzidas. A China foi a maior produtora mundial de suínos (53,4 milhões de toneladas) em 2017, seguida pela União Europeia ( 23,6 milhões de toneladas), Estados Unidos (11,6 milhões de toneladas) e Brasil (3,7 milhões de toneladas) (USDA, 2017). O Estado de Santa Catarina é o maior produtor de suínos no Brasil, seguido por Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (ABPA, 2017).

Com sua fundação em 1976, a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) é constituída por 34 unidades de ensino distribuídas por todo o estado de São Paulo. Sendo ofertados pela Unesp 136 cursos de graduação e 149 programas de pós-graduação (UNESP, 2018A).

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp foi instaurada em 1964 na cidade de Jaboticabal, São Paulo, e oferece o curso de Medicina Veterinária desde outubro de 1971. O curso de Medicina Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal conta com os departamentos de clínica e cirurgia veterinária, medicina veterinária preventiva e reprodução animal, morfologia e fisiologia animal e patologia veterinária (UNESP, 2018A).

O Laboratório de Pesquisa em Suínos (Labsui), pertencente ao departamento de clínica e cirurgia veterinária da Unesp – Jaboticabal, foi o local escolhido para realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) durante o período entre 19 de Fevereiro de 2018 a 10 de Maio de 2018, sendo realizado sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Carolina Kist Traesel e supervisão do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, perfazendo um total de 450 horas. O Labsui tem as suas atividades voltadas para a realização de pesquisas científicas na área de sanidade de suínos, sendo referência nacional e internacional. Os projetos de pesquisa desenvolvidos são sobre *Mycoplasma* e *Pestivirus*.

O presente relatório visa descrever as atividades acompanhadas e desenvolvidas no Labsui na Unesp – Jaboticabal durante a realização do ECSMV, assim como, breve revisão bibliográfica sobre BVDV e *M. suis*.

## **2 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

### **2.1 Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp - Jaboticabal)**

Fundada em 1976 através da junção dos Institutos Isolados de Ensino Superior do Estado de São Paulo, institutos estes que eram situados em várias cidades do interior paulista, a Unesp é conceituada como uma das melhores universidades brasileiras. O Governo do Estado de São Paulo é responsável por manter a universidade que conta com 34 unidades em 23 cidades mais a capital paulista. Além disso, a Unesp oferece 136 cursos de graduação e 149 programas de pós-graduação (UNESP, 2018A).

Atualmente, a Unesp possui cerca de 38 mil alunos de graduação, sendo que aproximadamente 14 mil profissionais estão matriculados nos programas de pós-graduação oferecidos pela universidade. Para garantir que todos os alunos tenham acesso a um ensino superior de qualidade, a Unesp conta com 3,7 mil professores e 6,7 mil funcionários (UNESP, 2018A).

O campus de Jaboticabal da Unesp (FIGURA 1), era constituído por 829 hectares, sendo 13 hectares ocupados por estrutura física. Os cursos de Administração, Ciências Agrônômicas, Ciências Biológicas, Medicina Veterinária e Zootecnia são oferecidos, além do programa de Residência em Medicina Veterinária e Saúde. É também incorporado à Unesp – Jaboticabal o Colégio Técnico Agrícola (UNESP, 2018B).

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp foi instaurada em 1964 e oferece o curso de Medicina Veterinária desde outubro de 1971. Atualmente, cerca de 1614 alunos cursam a graduação, 191 estudam no Colégio Agrícola e 971 fazem parte dos programas de pós graduação da referida Universidade. O quadro profissional da FCAV/Unesp é composto por 250 professores e pesquisadores além de 482 técnicos administrativos (UNESP, 2018B).

O curso de Medicina Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal conta com os departamentos de clínica e cirurgia veterinária, medicina veterinária preventiva e reprodução animal, morfologia e fisiologia animal e patologia veterinária (UNESP, 2018). O Labsui faz parte do departamento de clínica e cirurgia veterinária, local escolhido para realização do ECSMV.

O Labsui tem as suas atividades voltadas apenas para a realização de pesquisas científicas na área de sanidade de suínos, portanto o atendimento à comunidade não é realizado. Três doutorandos e dois mestrandos, juntamente com o auxílio do professor Dr. Luís Guilherme de Oliveira são os responsáveis pela condução dos projetos que dão prioridade aos estudos de *M. hyopneumoniae*, *Pestivirus* e *M. suis*.



FIGURA 1 - Entrada do prédio administrativo da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, no campus Jaboticabal, durante realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Fonte: Google Imagens (<http://www.101fm.com.br/101/camara-realiza-sessao-solene-na-unesp/>).

### 2.1.1 Estrutura física do Laboratório de Pesquisa em Suínos

O Labsui foi planejado e construído para a realização de pesquisas científicas. A estrutura física do laboratório é composta por sala de práticas, galpões e sala de reuniões. A sala de práticas é de fácil acesso, procurando visar sempre a biossegurança, podendo assim garantir a qualidade dos experimentos. Este espaço é composto por uma bancada, que é

utilizada para a realização de necropsias e práticas dos experimentos. Esta sala também possui um microscópio, dois freezers, armário para armazenamento de materiais e janela comunicante entre a sala e os galpões de maternidade para recebimento de materiais coletados (FIGURA 2).



FIGURA 2 - A: Placa na entrada do Laboratório de Pesquisa em Suínos. B: Sala destinada à realização de práticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal.

Para a alocação das fêmeas reprodutoras, o Labsui dispõe de um galpão com seis baias de gestação (2,47m x 1,75m), e quatro baias para leitões desmamados (2,7m x 1,46m). Cada baia de gestação conta com dois bebedouros do tipo *nipple*, um é usado pela fêmea adulta e outro pela leitegada, escamoteador preparado para receber instalação de lâmpadas infravermelho, piso vazado e comedouro (FIGURA 3). As baias de creche são constituídas por bebedouro tipo *nipple*, um comedouro e piso vazado para melhor manejo de dejetos.

Dentro deste galpão ficam armazenadas as bombonas contendo ração, demonstrando assim um ponto a ser melhorado na instalação. Durante o último mês do ECSMV, foi instalado um silo com sistema de alimentação automático dos comedouros, salientando a preocupação dos responsáveis pelo laboratório em melhorar a qualidade das instalações.



É notado também a falta de sistema de controle da temperatura como ventiladores e exaustores, evitando assim também o acúmulo de gases. Esta troca de gases e ventilação é realizada apenas por três janelas laterais e uma porta principal que são protegidas por telas.

Visando uma melhor biosseguridade ao plantel e maior garantia de qualidade aos experimentos, entre a sala de práticas e o galpão dos animais foi instalado um banheiro para realização de higiene pessoal e troca de roupas. Entretanto, o chuveiro não foi instalado até o término do ECSMV.

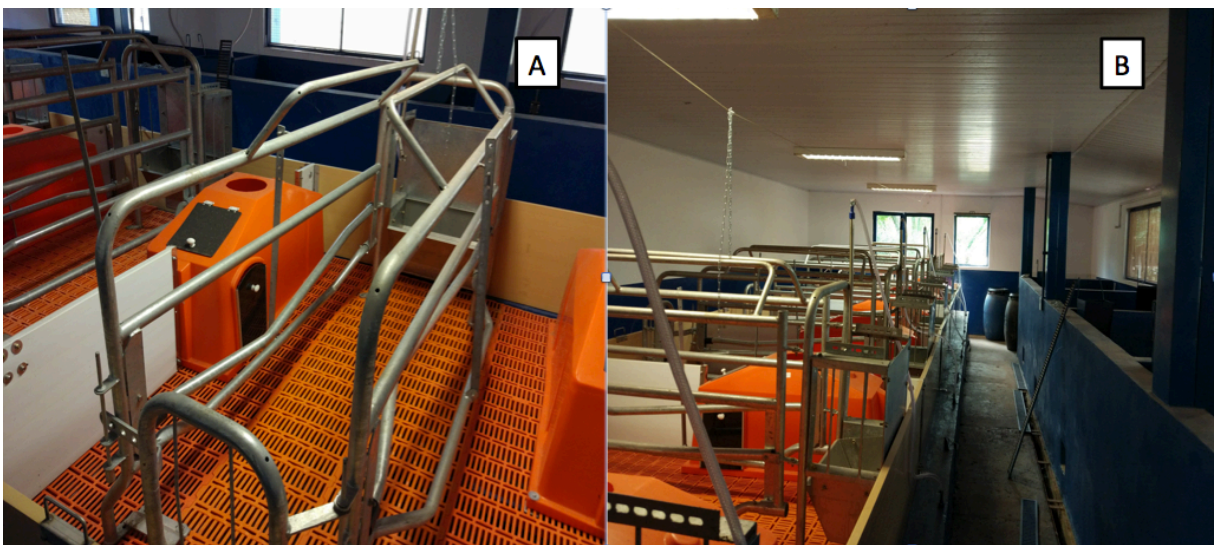


FIGURA 3 - A: Baia de gestação e parição com escamoteador. B: Visão geral do galpão onde ficam as baias de gestação e as baias de creche à direita no Laboratório de Pesquisa em Suínos na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal.

Completa a estrutura interna do laboratório, uma sala de estudos e reuniões onde contém uma geladeira, computador, telefone, impressora, armário e balcão para estudos,.

Na parte externa, o laboratório conta com 10 baias (3,82m x 2,82m) para alocação de cachaços ou animais em fase de creche, crescimento e terminação. Cada baia possui chão de cimento, bebedouros tipo *nipple* e comedouro em cimento. Entretanto, as baias são também utilizadas para alocação de equinos internados oriundos da Clínica Médica de Grandes Animais da FCAV/Unesp, não possuindo sistemas de controle de ambiente nem programa de controle de vetores. Esta falta de controle biológico demonstra que este espaço utilizado não foi projetado pensando em receber somente suínos e sim animais de diferentes espécies dependendo da necessidade da universidade.

Um galpão é utilizado para guardar diversos materiais e estocagem de aditivos suplementares das rações dos animais aos cuidados do laboratório. Juntamente, fica armazenada neste galpão uma autoclave que é utilizada pelos mestrandos e doutorandos do laboratório.

Por fim, o Labsui possui uma baia com manequim para coleta de sêmen, estando ao lado desta uma balança para realização de pesagem dos animais.

### **2.1.2 Laboratório destinado ao processamento de sêmen e sangue**

Ao lado do prédio do Labsui existe uma instalação com quatro laboratórios. Destes, o laboratório de microbiologia (FIGURA 4) foi utilizado para o preparo das amostras sanguíneas e diluição do sêmen.

O laboratório referido dispõe de duas estufas bacteriológicas, banho maria, banho seco, duas geladeiras, cinco freezers sendo que um deles é de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Também compõem o laboratório uma capela de fluxo laminar, agitador de tubos, centrífuga refrigerada, homogeneizador de amostras, balança de precisão, além de três botijões com nitrogênio líquido. Por fim, computador, armário para armazenamento de materiais plásticos e vidrarias, bem como uma pia para higienização de materiais completam a estrutura deste laboratório.





FIGURA 4 - Laboratório de microbiologia anexo ao Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal, utilizado para conservação sanguínea e diluição de sêmen.

## 2.2 Descrição das atividades acompanhadas durante o ECSMV no Labsui/Unesp – Jaboticabal

As atividades desenvolvidas durante o ECSMV eram relacionadas a dois projetos de pesquisa que buscam um melhor entendimento sobre a transmissão do BVDV 2 e também visam caracterizar a prevalência da infecção de *M. suis* em rebanhos suínos no Estado de Santa Catarina. Para melhor conhecimento, todas as atividades desenvolvidas pelo estagiário estão dispostas em forma de tabela (TABELA 1).

TABELA 1 - Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Unesp – Jaboticabal.

<b>Atividades acompanhadas</b>	<b>Quantidade (N)</b>	<b>(%)</b>
Coleta sanguínea	120	57,4%
Palestra	21	10,0%
Inseminação	16	7,8%
Discussão de artigo	12	5,7%
Aula da pós graduação	10	4,8%
Extração de DNA	10	4,8%
Coleta de sêmen	6	2,9%
Diluição de sêmen	6	2,9%
Organização de Palestra	2	0,9%
Projeto acompanhado	2	0,9%
Aula prática	2	0,9%
Visita técnica	1	0,5%
Curso	1	0,5%
<b>Total</b>	<b>209</b>	<b>100%</b>

Surgiram oportunidades de acompanhar palestras de profissionais renomados na suinocultura, uma vez que estes visitaram o Labsui ou eventos era visitados pelos integrantes do laboratório. Atividades como coleta sanguínea, discussão de artigos, aulas da pós-graduação, organização de palestras e aulas práticas foram também acompanhadas.

Outras atividades foram realizadas além das descritas na tabela 1, tais como manejo alimentar, manejo sanitário e manejo visando o bem estar dos animais.

O Labsui é completamente voltado ao desenvolvimento de pesquisas, portanto não oferece atendimento de rotina ao público. Projetos de pesquisa são desenvolvidos, voltados ao estudo de quatro diferentes agentes: Vírus da diarreia viral bovina (BVDV), *M. hyopneumoniae*, *M. suis* e *Pestivirus* atípico.

Os integrantes do Labsui possuem um grupo de estudos e discussão, liderado pelo professor Dr. Luís Guilherme, com encontros uma vez por semana. Artigos de diferentes assuntos, todos voltados para a área de sanidade dos suínos, eram revisados e discutidos. Esta ação deve ser ressaltada positivamente, pois é uma maneira de manter sempre a equipe

atualizada. O estagiário ficava à disposição dos doutorandos e mestrados para ajudar na execução de seus respectivos projetos.

## **2.2.1 Projeto BVDV**

### **2.2.1.1 Coleta e processamento das amostras sanguíneas**

Foram alojados nas baias externas do Labsui dois cachacos e oito fêmeas primíparas. As fêmeas foram separadas em dois grupos: um grupo controle com duas marrãs e outro grupo com seis fêmeas, que receberiam uma dose de sêmen contaminado com BVDV-2. O estagiário tinha como função alimentar os animais e limpar as baias.

Devido ao período programado para a realização do teste de vírusneutralização não ser o mesmo programado para o ECSMV, o teste não pode ser acompanhado.

Para a realização do teste de vírus neutralização foram realizadas coletas de sangue a cada quatro dias, dentro de um período total de 60 dias, sendo utilizadas seringas de 10 ml e agulhas 40 x 12 mm. Para o armazenamento do sangue foram usados tubos (de coleta) plásticos contendo substância anticoagulante (EDTA) para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e substância ativadora de coágulo (sílica) para vírus neutralização.

O processo de congelamento do sangue total era iniciado dentro da capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. Com o auxílio de um micropipetador, 2 ml de sangue foram retirados dos tubos que continham EDTA, colocados em microtubos e identificados, sendo que este processo, por motivo de segurança, era realizado em duplicata.

Os microtubos eram então colocados numa alça para congelamento e mergulhados em nitrogênio líquido por 20 segundos, sendo então armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No total, 120 coletas de sangue foram realizadas.

Para a obtenção do soro, o sangue que estava nos tubos de, ficou repousando em temperatura ambiente durante 90 minutos para a separação da parte vermelha do sangue e obtenção de soro. O sangue então era centrifugado por 10 minutos a 4000 RPM. Após o término deste processo, o soro era coletado com o auxílio de uma micropipeta, envazado em microtubos, identificados e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.1.2 Coleta e processamento do sêmen

A realização da coleta de sêmen foi feita em dois cachacos, advindos de granja comercial. O sêmen era coletado logo após a detecção de cio nas fêmeas suínas, para posterior inseminação artificial (FIGURA 5). Na coleta foi empregado o uso de um copo térmico, próprio para a realização desta, copo descartável, filtro de papel, elástico para fixar o filtro à borda do copo e luvas de vinil.

Previamente à coleta, era realizada lavagem do pênis e prepúcio do animal utilizando água corrente. O animal a ser coletado era então conduzido ao manequim e ao ser estimulado por sinais sonoros e visuais realizava a monta. A pessoa responsável pela coleta, utilizava luvas de vinil, segurava firmemente com uma das mãos o pênis do varrão, realizando uma leve massagem para o estímulo da ejaculação.

Os dois primeiros jatos eram descartados, já que a fração pré-espermática do ejaculado, os 15 ml iniciais, serve como lubrificação e não possui espermatozoides (BORTOLOZZO et al., 2005), evitando assim também contaminação bacteriana. O restante do ejaculado era depositado sobre o filtro. Quando o reprodutor saía do manequim a coleta era finalizada. O filtro tinha como finalidade separar o sêmen da porção gelatinosa, porção esta que possui a função de evitar o refluxo de sêmen advindo da cérvix quando da monta natural (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2005).

Logo após a coleta, o sêmen era levado ao laboratório auxiliar, avaliado quanto aos aspectos físicos como cor e odor e imediatamente colocado em banho maria a 37<sup>0</sup>C, evitando assim diminuição de função espermática. Uma pequena fração era retirada, colocada sobre lâmina e sob lamínula para avaliação de motilidade (>70%), concentração e morfologia.

Para a diluição e envase das doses inseminantes, o diluente era preparado anteriormente à coleta de sêmen. Eram necessários na preparação do diluente água destilada, que era mantida a 37<sup>0</sup>C, e o conteúdo do sachê, contendo 40 gramas de diluente comercial. O conteúdo era então misturado à água destilada até sua total absorção.

O diluente comercial MR-A<sup>®</sup> (Kubus<sup>®</sup>, Las Rozas de Madrid-Espanha) é composto por glicose, citrato de sódio, acetato de potássio, EDTA e aminoglicosídeos. Posteriormente ao processo de homogeneização, a solução então era mantida a 37<sup>0</sup>C. Após a avaliação morfológica e vigor do sêmen, posteriormente à sua chegada ao laboratório, este era mensurado quanto ao volume e diluído na fração de 1:1, sempre colocando no sentido do

diluído sobre o ejaculado. Após esta pré-diluição, deixava-se a amostra num período de 10 minutos de descanso e então era colocado diluído até alcançar o fracionamento desejado.

A concentração entre  $3,0$  a  $3,5 \times 10^9$ /dose inseminante é padronizada para a técnica de inseminação artificial intra-cervical (IAIC) (MOREIRA et al., 2013). O último passo era o envase das doses inseminantes em frascos de 100ml e deixar descansando por 90 minutos antes de colocar em uma caixa de isopor com gelo reutilizável, tomando o cuidado para que a temperatura interna da caixa se mantivesse entre  $15$  e  $18^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.1.3 Inseminação artificial intra-cervical**

Visando a indução e detecção de cio nas oito fêmeas participantes do projeto, um dos varrões era passado em frente às baias das marrãs por um tempo total de 15 minutos, depois o outro macho era passado seguindo o mesmo protocolo (FIGURA 5A). Enquanto os cachos caminhavam em frente às baias, uma pessoa pressionava o dorso das fêmeas suínas procurando observar o comportamento referente ao cio, que neste caso, era o ato da total imobilidade da marrã frente a pressão exercida sobre seu dorso. Também era visualizado a vulva de cada fêmea suína observando se estava hiperêmica, edemaciada e com presença de secreção vulvar, sinais indicativos de que a marrã se encontra em cio (EMBRAPA, 1993).

Quando se obtinha a confirmação do estro em alguma das fêmeas, então o material para a realização da inseminação era separado e se realizava a coleta de sêmen para preparo das doses inseminantes (FIGURA 5B). Uma bandeja foi organizada contendo os seguintes materiais necessários: papel toalha, gel lubrificante, pipeta para IAIC e frasco da dose inseminante.



FIGURA 5 - Verificação de estro (A) e coleta de sêmen (B) em suínos pertencentes a projeto desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal

Antes da realização da inseminação, o sêmen era contaminado, acrescentando-se  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> de BVDV-2, contidos em 1,5 ml, de um isolado de campo do BVDV-2 que apresentou alta patogenicidade em bovinos, para cada 50 ml de sêmen diluído. O inóculo se encontrava congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e o descongelamento da amostra foi realizada em banhomaria a  $37^{\circ}\text{C}$ , imediatamente antes da contaminação. O procedimento de contaminação era realizado dentro da capela de fluxo laminar, procurando minimizar a chance de contaminação por outros agentes.

Para que a marrã ficasse na posição certa para inseminar, uma pessoa exercia pressão sobre seu dorso, mimetizando a pressão exercida pelo macho no momento da monta natural. O inseminador limpava a vulva da fêmea com papel toalha, lubrificava a ponta da pipeta e a introduzia no canal vaginal até encontrar resistência, significando que alcançou a entrada da cérvix. Após este passo, o frasco era acoplado à outra ponta da pipeta e colocado na posição vertical em uma altura maior que a linha do dorso, deixando que por gravidade e uma leve pressão o sêmen diluído contendo BVDV-2 fosse depositado dentro da cérvix da fêmea suína. Ao final de todo o conteúdo dentro do frasco a pipeta era retirada e a IAIC estava finalizada.

Ao ser finalizada a IAIC, a fêmea suína tinha as costas marcadas com tinta própria para marcação animal, com o objetivo de identificar quais haviam sido inseminadas.

O procedimento de inseminação era realizado duas vezes, respeitando um intervalo de 12 horas entre eles, visando o aumento da taxa de concepção. Todas as oito marrãs foram inseminadas dentro de um intervalo de nove dias (TABELA 2).

TABELA 2 - Relação de fêmeas suínas inseminadas e infectadas, ou não, de acordo com grupo e volume de suspensão viral inoculada durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Unesp – Jaboticabal.

<b>Grupo</b>	<b>Estado</b>	<b>Inseminação</b>	<b>Volume inoculado / 100 ml sêmen</b>
1 - G1	Infectada	12 / Março	3 ml
2 - G1	Infectada	11 / Março	3 ml
3 - G1	Infectada	13 / Março	3 ml
4 - G1	Infectada	10 / Março	3 ml
5 - G1	Infectada	14 / Março	3 ml
6 - G1	Infectada	18 / Março	3 ml
2 - Controle	Não Infectada	11 / Março	0 ml
3 - Controle	Não Infectada	13 / Março	0 ml

No decorrer de 30 dias após a data das inseminações, o diagnóstico de gestação ou retorno ao cio foi realizado. O procedimento realizado foi o mesmo feito para se detectar o cio anteriormente. A falta de apresentação dos sinais de estro indicava que a fêmea estava prenhe. Caso a fêmea apresentasse retorno ao cio, então esta seria inseminada novamente.

Não foi usado ultrassonografia para o diagnóstico de prenhez devido ao método utilizado, que é a passagem do macho, ser mais rápido e pensando em uma granja comercial seria necessário uma maior e especializada mão de obra. Todas as oito marrãs apresentaram sinais de prenhez 15 dias após a realização da IAIC.

## 2.2.2 Projeto *Mycoplasma suis*

### 2.2.2.1 Extração de DNA

Diferentes materiais biológicos podem ser usados na extração de DNA sendo que neste caso foi utilizado sangue de matrizes suínas de descarte de uma granja comercial. O sangue foi coletado no momento do abate destes animais, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em um freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Devido a grande quantidade de material a ser processado, eram extraídas 40 amostras por ciclo, totalizando 400 alíquotas, porém o armazenamento foi realizado em duplicata visando evitar possíveis perdas.

Inicialmente as amostras sanguíneas foram descongeladas em temperatura ambiente. Os materiais utilizados na extração foram: microtubos, micropipetas, ponteiros de 1000  $\mu\text{l}$ , papel toalha, vórtex, banho seco, centrífuga refrigerada, estufa, tampão de lise, beta-mercaptoetanol, acetato de potássio, clorofórmio, álcool isoamílico, álcool absoluto e álcool 70%. É importante ressaltar que todos os materiais utilizados eram estéreis.

Para iniciar o processo de extração, os microtubos foram devidamente identificados e separados. Então, dentro de cada microtubo, eram pipetados primeiramente 1,6  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol juntamente com 800  $\mu\text{l}$  de tampão de lise e 250  $\mu\text{l}$  da amostra de sangue.

O  $\beta$ -mercaptoetanol é uma substância antioxidante e tem como função neutralizar a ação de metabólitos secundários ao processo e evitar que uma molécula de DNA se ligue em outra molécula. Com a função de causar lise das células na amostra, o tampão de lise, era composto por hidroximetil aminometano hidrocloreto (Tris HCL), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), polivinilpirrolidona (PVP), dodecil sulfato de sódio (SDS) e cloreto de sódio (NaCl). Para a preparação desta solução foi utilizados 80 ml de Tris HCl com pH 8, concentração de 160 mmol, substância esta utilizada para manter o pH ótimo (pH 8) para que a reação pudesse ocorrer. O EDTA tem como função inibir a ação das nucleases, enzimas que degradariam o material genético na amostra, foi utilizado na concentração de 60 mmol num volume de 60 ml. Foram utilizados 20 ml de NaCl na concentração de 20 mol como ionizador, visando a instabilidade da membrana. Também foram utilizados 2,5 g de SDS 5%, detergente para potencializar a quebra da membrana celular, e 5 g de PVP 1% que possui ação antioxidante (SILVA et al., 2014)



Após todos os componentes serem pipetados nos microtubos, estes eram agitados no vórtex durante dez segundos e colocados no banho seco a 65<sup>0</sup>C por 40 minutos. A cada 15 minutos agitava-se os microtubos brevemente, garantindo assim a homogeneidade da solução.

Concluído o período de 40 minutos, adicionava-se 300 µl de acetato de potássio ao conteúdo dentro dos microtubos, visando assim a precipitação de proteínas e outros contaminantes. Os microtubos foram homogeneizados rapidamente no vórtex e colocados durante 30 minutos a 7<sup>0</sup>C para que diminuísse a solubilidade da solução, favorecendo a precipitação do SDS. Após este tempo de espera e posterior centrifugação por 10 minutos a 12000 RPM / 10<sup>0</sup>C o sobrenadante que se formou foi retirado e depositado em outro microtubo, devidamente identificado (FIGURA 6A).

A adição de 600 µl clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 tem como objetivo a retirada dos lipídeos. Devido o clorofórmio ser uma molécula apolar, assim como os lipídeos, ocorre um agrupamento das moléculas gordurosas formando micelas juntamente com o clorofórmio, e este faz com que aumente a densidade destas micelas, facilitando a precipitação das moléculas gordurosas em meio polar. O álcool izoamílico foi utilizado para evitar a formação de bolhas durante a agitação.

A precipitação dos lipídeos ocorria após cada amostra ser passada por vórtex durante 10 segundos e centrifugadas a 12000 RPM / 10<sup>0</sup>C por 10 minutos, então por densidade lipídeos e clorofórmio se separavam do restante do conteúdo ficando depositados no fundo do microtubo (FIGURA 6B). O sobrenadante era então retirado com auxílio de uma micropipeta, tomando o devido cuidado para não romper a membrana de restos celulares formada entre o sobrenadante e o clorofórmio, sendo assim depositado em outro microtubo.

Procurando obter uma amostra mais pura possível, 1 ml de álcool absoluto foi colocado em cada microtubo. O etanol promove o agrupamento dos ácidos nucleicos presentes na solução através de uma transição estrutural (ALMEIDA, 2011). Este processo necessita de tempo para ocorrer, então as amostras foram armazenadas a -20<sup>0</sup>C de um dia para o outro (FIGURA 6C).

Após o processo *overnight*, os microtubos foram centrifugados a 12000 RPM a 10<sup>0</sup>C por 20 minutos. Um pélete contendo o material genético formou-se no fundo do microtubo (FIGURA 6D). O líquido foi removido por gravidade, secou-se a borda de cada microtubo com papel toalha limpo, retirando o excesso de etanol 100%.

Para maximizar a retirada de sais restantes na amostra de DNA, foram adicionados 800 µl de etanol 70%. Como o cloreto de sódio é pouco solúvel em etanol, então a solução alcoólica usada de concentração mais baixa facilitava a purificação da amostra (OLIVEIRA et

al., 2007). Após a colocação do álcool 70%, os microtubos foram centrifugados a 12000 RPM a 10<sup>0</sup>C por 20 minutos, sendo utilizado para a retirada do excesso de álcool o mesmo processo supracitado.

Visando acabar com os resquícios de etanol, pois este acaba por inibir a reação em cadeia de polimerase (PCR), os microtubos foram colocados, com a tampa aberta e forrada por papel toalha, dentro de uma estufa a 40<sup>0</sup>C por duas horas.

Após a secagem em estufa, foram adicionados aos microtubos 60 µl de substância eluente da Qiagen<sup>®</sup> (Hilden-Alemanha) depositado no centro da amostra para completa eluição do DNA e os microtubos foram armazenados por duas horas em geladeira a 7<sup>0</sup>C. O sobrenadante, contendo material genético, foi retirado e os microtubos armazenados em freezer a -20<sup>0</sup>C.

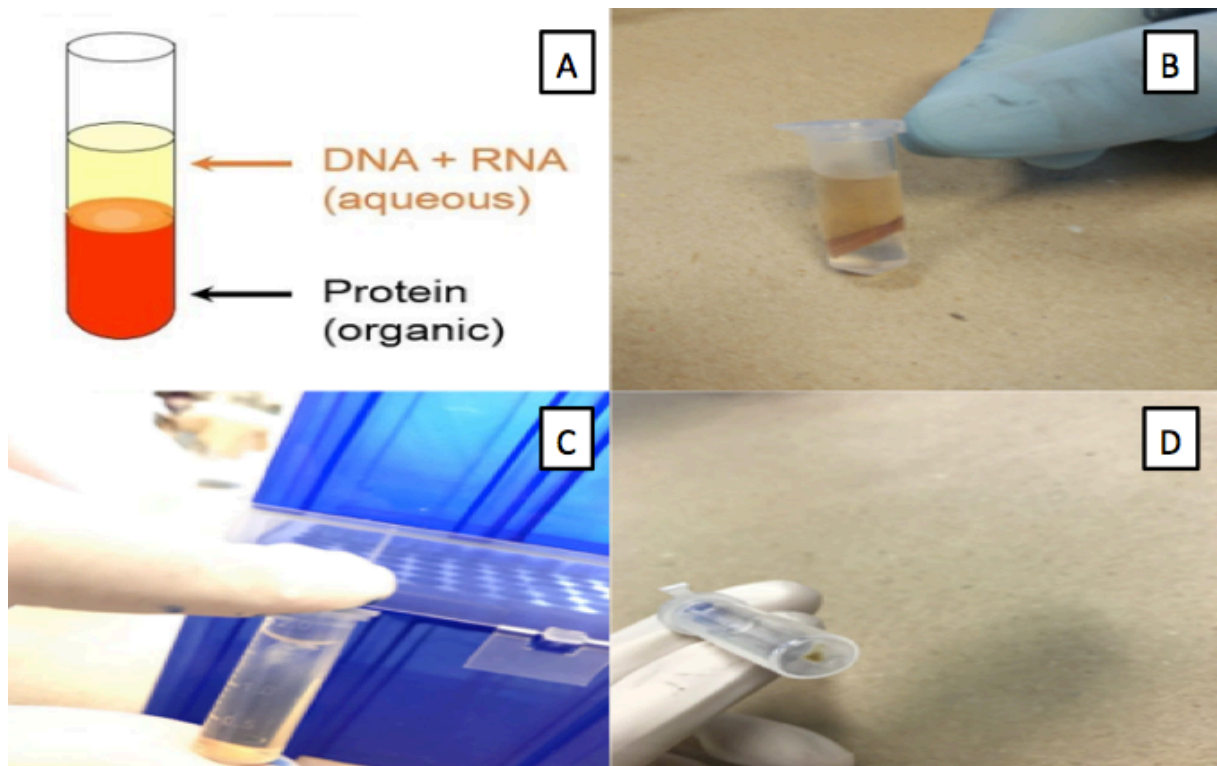


FIGURA 6 - Fases de uma extração de DNA realizada durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Pesquisa em Suínos da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” no campus Jaboticabal. A: desenho esquemático demonstrando a separação do material genético da parte orgânica da amostra logo após primeira reação e centrifugação. Fonte: GENE TARGET SOLUTIONS (<https://www.genetargetsolutions.com.au/product/5prime-phase-lock-gel/>); B: amostra logo após segunda centrifugação, evidenciando a separação do material genético na parte superior seguido da membrana de restos celulares e clorofórmio mais a baixo; C: agrupamento dos ácidos nucleicos presentes na solução logo após o processo *overnight*; D: pélete contendo DNA formado no fundo do microtubo pronto para a eluição e congelamento.

### 2.2.3 Visita técnica

Pode ser acompanhado durante o ECSMV uma visita técnica a uma unidade produtora de leitões na cidade de Holambra – SP. Todas as instalações da granja foram visitadas, bem como foram aplicadas estratégias de manejo reprodutivo, sanitário e nutricional aplicados na propriedade.

A granja contava com 500 matrizes suínas, com partos e inseminações ocorrendo diariamente. Os animais nascidos eram mantidos na granja até atingirem peso mínimo de 24 quilos numa idade aproximada de 63 dias. Após este período eram transferidos para outra unidade da granja, que não foi visitada, até atingir o peso esperado para abate, entre 90 e 110 kg dependendo do comprador. A instalação dos leitões pós desmame, fase de creche, continha piso plástico vazado, comedouro automático, bebedouros tipo *nipple* e cortinas. As baias de maternidade eram individuais e dispunham da mesma estrutura que as baias da creche, porém contava com escamoteador.

É importante ressaltar as falhas de manejo e biosseguridade visualizadas na granja. Logo na chegada à granja foi percebida a falta de um cinturão verde para evitar a entrada de patógenos via correntes de ar. Também não foi necessário que os visitantes tomassem banho ou trocassem suas roupas, evidenciando uma falha na prevenção de doenças. Dentro da propriedade pode ser visualizada a presença de outras espécies animais, fato que colabora para a entrada e propagação de patógenos.

A instalação dos leitões pós desmame possuía piso plástico vazado, comedouro automático, bebedouros tipo *nipple* e cortinas. Os reprodutores e matrizes eram mantidos em suas respectivas instalações, porém foi notado que o piso era de concreto e tinha uma lâmina d'água correndo ao fundo destas baias.

O fato de haver a lâmina d'água na baia dos animais reprodutores é de grande importância negativamente, pois o piso maciço pode levar os animais a apresentar problemas no aparelho locomotor. O piso maciço promove o acúmulo de fezes e urina favorecendo a ocorrência de doenças respiratórias e entéricas. A umidade nas baias aumenta devido a presença da lâmina d'água, facilitando a proliferação de patógenos e não promovendo um escoamento eficiente dos dejetos.

## 3 – DISCUSSÃO

### 3.1 BVDV

Um dos projetos de pesquisa desenvolvido no Labsui é voltado para a pesquisa do vírus da diarreia viral bovina 2 (BVDV-2) em suínos. Semelhante ao que ocorre em ruminantes, espera-se que o sêmen do suíno dissemine o patógeno, principalmente com o avanço das biotecnologias da reprodução. Procurando a confirmação desta hipótese, cachacos foram infectados experimentalmente, em um momento anterior ao período de estágio, esperando que fosse detectado o BVDV-2 no sêmen, entretanto não foi detectada excreção viral através do sêmen após PCR. Além disso, fêmeas suínas foram inseminadas com sêmen experimentalmente infectado por BVDV-2, esperando que elas apresentassem soroconversão para o vírus inoculado.

Os *Pestivirus* pertencem à família *Flaviviridae*, com ocorrência mundial causando prejuízos reprodutivos, econômicos e produtivos na suinocultura, bovinocultura e ovinocultura. Quatro espécies compõem o gênero *Pestivirus*: vírus da diarreia viral bovina 1 e 2 (BVDV) acometendo bovinos, suínos e ovinos; vírus da doença da fronteira (BDV) que acomete principalmente ovinos, porém pode causar doença em suínos e bovinos; vírus da peste suína clássica (CSFV) ocorrendo em suínos, porém podendo ser transmitido para bovinos (ICTV, 2018). Os pestivírus atípicos foram recentemente descobertos e um tem sido relacionado com tremor congênito em leitões (POSTEL et al., 2016).

Os pestivírus possuem RNA de fita simples, são envelopados, esféricos, sensíveis a solventes, e podem ser congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou liofilizados, possibilitando seu armazenamento durante anos (DONIS et al., 1995). Devido à similaridade antigênica entre os BVDV (tipo 1 e 2) e o vírus da PSC, o BVDV tem assumido importância na suinocultura mundial pela capacidade de gerar reações cruzadas em testes diagnósticos, produzindo no hospedeiro também sinais clínicos parecidos com os sinais da PSC, tais como piroxia, retorno ao cio, nascimento de animais fracos e aborto. Desta forma, sendo um desafio a realização de um diagnóstico preciso (FLORES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014; ALMEIDA, 2015).

Testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-BVDV parecem ser os menos custosos, mais eficientes e de fácil realização para a confirmação dos animais infectados,

justificando o uso deste teste na realização do projeto acompanhado. Para se diagnosticar a exposição do animal ao vírus da PSC, o teste de imunofluorescência direta (IFD) apresentou facilidade na identificação de células de cultivo celular infectadas com CSFV, soro e sangue total de suínos infectados (GONZÁLEZ et al., 2014).

Testes confirmatórios visando a diferenciação, nos casos de reação cruzada, devem ser realizados. O teste de eleição para identificação é o teste de vírus neutralização comparativa. Estes testes confirmatórios são de extrema necessidade pois, em casos de PSC, a principal medida de controle é o abate de todo o rebanho (OIE, 2009).

A transmissão do BVDV pode ocorrer por contato direto e indireto entre os animais. O vírus, em bovino, pode ser eliminados através de secreções nasais, sêmen, urina e fezes. A transmissão transplacentária também ocorre em vacas prenhes. Os animais podem ser portadores sintomáticos ou assintomáticos, ocorrendo com frequência o nascimento de animais persistentemente infectados. Estes animais possuem importante papel na manutenção e transmissão do vírus dentro do rebanho (CANÁRIO et al., 2009; LOPES et al, 2010). Segundo Grooms (2004), se a infecção pelo BVDV ocorrer entre 90 e 120 dias de gestação na fêmea bovina, o feto reconhecerá o vírus como próprio, resultando assim em um animal persistentemente infectado.

Segundo Dias (2008), 26 rebanhos bovinos não vacinados provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo foram testados e 39,2% dos animais eram positivos para BVDV -1 ou BVDV-2. Após infecção experimental, a viremia é detectada em até 20 dias e mesmo após diluição e congelamento do sêmen, o agente se mantém viável. Fêmeas bovinas inseminadas artificialmente tiveram anticorpos específicos para BVDV detectados 15 dias após inseminação com sêmen contaminado (KIRKLAND et al.,1991; 1993). Justifica-se então, a hipótese de que fêmeas suínas possam ser contaminadas através da inseminação artificial.

Já as infecções causadas por BVDV em suínos são em sua maioria assintomáticas, mas podendo os animais apresentar sinais como abortamento, leitões natimortos, leitegadas debilitadas, má formações e nascimento de animais persistentemente infectados (BECHER et al., 2003).

O aumento da utilização das biotécnicas da reprodução, tais como transferência de embrião e inseminação artificial tem desempenhado um importante papel na disseminação do BVDV, tendo em vista que o sêmen bovino tem a capacidade de transmitir o vírus, causando infecção (MASCITTI et al., 2017). Concordando com isso, Maes et al., (2016) relatam o absoluto uso da inseminação artificial para reprodução na suinocultura comercial, mostrando o quanto os profissionais que trabalham garantindo a sanidade dos suínos necessitam estar

atentos, procurando sempre evitar a entrada de agentes nos rebanhos, afim de garantir os melhores resultados na produção.

São vários os agentes virais excretados via sêmen nos suínos, vírus estes que são de importância para a suinocultura mundial, como o vírus causador da doença de Aujeszky (OLIVEIRA, 2011), o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRSV) (CIACCI-ZANELLA et al., 2002), circovírus 2 (GERBER et al., 2010) e parvovírus suíno (HAACH et al., 2016).

Smit et al. (1999) afirmam que, em estudo realizado na Holanda, cachorros infectados com o CSFV excretaram o vírus via sêmen e consequentemente infectaram matrizes e fetos via inseminação artificial. A detecção foi realizada através de RT-PCR, e após avaliação de morfologia, motilidade e concentração, foi visto que o vírus não provoca alterações, fazendo com que viabilize o uso do sêmen caso não seja realizada previa detecção.

Durante o período de estágio, foi possível acompanhar algumas etapas de um estudo desenvolvido no Labsui visando melhor elucidação sobre as formas de transmissão do BVDV em suínos experimentalmente infectados. Está comprovado na literatura que o BVDV é capaz de causar infecção em suínos, no entanto, o modo de transmissão não foi ainda comprovado.

Os testes de PCR e vírus-neutralização não haviam sido realizados até a data final do ECSMV.

### **3.2 *Mycoplasma suis***

Podendo causar infecções clínicas e subclínicas, o *M. suis* é um agente economicamente importante na suinocultura, podendo acometer animais em diferentes fases de crescimento (YUAN et al., 2009). Devido ao agente ser ainda pouco estudado no Brasil, o projeto objetiva realizar estudos epidemiológicos em granjas comerciais no Estado de Santa Catarina, através de PCR em amostras sanguíneas de fêmeas de descarte.

O *M. suis* é o agente bacteriano, contendo DNA em seu genoma, causador da eperitrozonose suína e é um agente de importância zoonótica. Pertencente ao gênero *Mycoplasma*, à família *Mycoplasmataceae* e à classe *Mollicutes*, o *M. suis* possui como principal característica a ausência de parede celular, sendo também caracterizada como uma bactéria hemotrófica, pelo tropismo que esta apresenta pelas hemácias (PETERS et al., 2008; YUAN et al., 2009; VIEIRA et al., 2011).

O *M. suis* é uma bactéria intracelular obrigatória, apesar de pesquisadores durante muito tempo acreditarem que ela somente se aderiria à superfície do eritrócito (MESSICK et al., 2004). A bactéria possui o diâmetro de 0,8 a 1,0 µm, porém no estágio agudo da infecção pode ser encontrada em um tamanho maior (GROEBEL et al., 2009; BORDIN, 2012). Por acometer as células vermelhas do sangue em suínos, a infecção por *M. suis* está intimamente ligada à ocorrência de anemia hemolítica em suínos de todo o mundo, causando grandes perdas econômicas (RITZMANN et al., 2009).

Animais em fase de maternidade, creche, crescimento e matrizes são epidemiologicamente mais susceptíveis à infecção pelo *M. suis* e, uma vez infectados, tornam-se portadores por toda a vida. A transmissão pode ocorrer através de fômites e vetores como a mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*), o mosquito *Aedes aegypti* e o piolho *Haematopinus suis* (PRULLAGE et al., 1993; HOELZLE et al., 2007a; SMOLA et al., 2008). Dietz et al. (2014) concordaram relatando que detectaram o *M. suis* em amostras de urina, saliva, secreção nasal e vaginal, podendo também ocorrer transmissão indireta através da inalação de micropartículas de poeira.

O *M. suis* causa infecção persistente e provoca diferentes sinais clínicos nos suínos. Quando o *M. suis* infecta a corrente sanguínea do suíno, uma resposta febril é desenvolvida sete ou oito dias após a ocorrência da infecção. Durante a fase aguda da doença a infecção dos eritrócitos é intensa, podendo causar hipoglicemia, convulsão e morte (MESSICK et al., 2004; STRAIT et al., 2012).

A eperitrozoose, quando na sua forma crônica, pode causar anemia hemolítica, causando, assim, trombocitopenia e diminuição de hematócrito. Além disso, causa anemia em neonatos, crescimento retardado, icterícia, disgalaxia em fêmeas reprodutoras e baixa da performance reprodutiva do rebanho (HOELZLE et al., 2003; STRAIT et al., 2012).

Sokoli et al. (2013) justificam isso relatando que, animais jovens ao serem necropsiados apresentam palidez dos órgãos, icterícia, densidade sanguínea diminuída, modesta esplenomegalia e, em regiões de clima frio, pode ser observado necrose de extremidades. Em animais mais velhos, os mesmos sinais podem ser observados além de esplenomegalia mais acentuada.

Duas proteínas são responsáveis pela adesão do *M. suis* à superfície da hemácia: MSG1 e a  $\alpha$ -enolase, sendo então os mais importantes fatores de virulência desta bactéria. O *M. suis* através destas proteínas se aderem à superfície do eritrócito através de ligações fibrilares causando deformação celular e hemólise extravascular no fígado, baço e medula óssea (GUIMARÃES et al., 2011A; HOELZLE et al., 2014;).

As proteínas de adesão do *M. suis* desempenham duas importantes funções no mecanismo de adesão à hemácia: MSG1 expressa *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), uma enzima que age sobre as moléculas de glucose e carboidrato para a obtenção de energia; a  $\alpha$ -enolase atua na adesão do *M. suis* à superfície do eritrócito (HOELZLE et al., 2007b; SCHREINER et al., 2012).

O *M. suis* usa um mecanismo semelhante à endocitose para penetrar a célula vermelha. A bactéria atua sobre a superfície celular provocando invaginações na membrana, seguido de depressões que provocam uma abertura por onde a bactéria penetra. Após a entrada do agente na hemácia, acontece a formação de vacúolos intracelulares e então a membrana celular se funde novamente, evitando a lise celular e promovendo um meio de evasão do *M. suis* ao sistema imune (GROEBEL et al., 2009; SOKOLI et al., 2013).

Segundo Sokoli et al. (2013), o *M. suis* interage com as células do tecido endotelial e, a partir da ativação da resposta imune local, os eritrócitos acabam se aderindo à parede do vaso sanguíneo, portanto, dano à parede do vaso também pode ser observado. Hemorragia, oclusão de vasos e coagulação intravascular pode ser observada em suínos infectados por *M. suis*.

Infecções causadas por *M. suis* são poucos diagnosticadas devido à baixa especificidade e sensibilidade dos métodos diagnósticos aplicados. Justificando a escolha da coleta sanguínea para realização das PCR's, Messick et al. (2004) dizem que sangue dos rebanhos apresentando sinais clínicos parecidos com os da eperitrozoonose deve ser coletado para diagnóstico confirmatório.

Animais acometidos e coletados durante a fase aguda da doença possuem maiores níveis de infecção do que os animais em fase crônica facilitando o diagnóstico por esfregaço (HOELZLE et al., 2014). Esfregaço sanguíneo pode ser usado como diagnóstico para visualização da bactéria e confirmação da infecção por *M. suis*., entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade devido à dificuldade de visualização do agente (GROEBEL et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2011b). Testes sorológicos como ELISA e hemaglutinação indireta podem ser realizados na pesquisa da infecção porém, segundo Vieira et al. (2011), o uso da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é mais eficiente quanto a sensibilidade e especificidade, concordando com o que disse Groebel (2009) e Guimarães (2011b).

Ainda que exista métodos baratos para se chegar ao diagnóstico e métodos com grande especificidade e sensibilidade estejam sendo desenvolvidos cada vez mais, as características epidemiológicas precisam ser mais estudadas. Hoelzle et al. (2007C), descrevem que os



métodos quantitativos irão permitir que formas de controlar e prevenir a heperitroozoonose sejam desenvolvidos. Hoelzle et al. (2009), concordaram quando, testaram uma vacina recombinante usando a proteína de adesão MSG1 e, apesar de observarem forte resposta imune, os animais não conseguiram desenvolver uma resposta efetiva na proteção contra a infecção por *M. suis*.

Não foi possível acompanhar o projeto em toda sua execução devido ao fim do período de estágio, impossibilitando acompanhar os resultados.

## 4 – CONCLUSÕES

O período de estágio curricular supervisionado em medicina veterinária (ECSMV) realizado no Laboratório de Sanidade Suína (Labsui), concentrado na área de Sanidade de Suínos, pertencente à Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (Unesp), foi de extrema importância, pois foi possível acompanhar diversas atividades diferentes das previamente vivenciadas durante o período de graduação na Universidade Federal do Pampa, além de poder fixar o que já havia aprendido.

As atividades acompanhadas foram de extrema importância para que o que foi, em sua maioria, visto na teoria durante a graduação fosse fixado colocando o que foi aprendido em prática, além de adquirir novos conhecimentos..

Os projetos acompanhados, as discussões de artigos, palestras, visitas técnicas e cursos realizados trouxeram a oportunidade de aprofundar os estudos sobre a sanidade dos suínos, área esta que lhe desperta extremo interesse. A convivência diária e contínua com pesquisadores ajudaram o estagiário a desenvolver curiosidade sobre a área, que no dia a dia pode ser um fator importante na solução de problemas.

A realização do ECSMV foi de grande valia, pois estimulou o estagiário a sair de sua zona de conforto, incentivando-o a desenvolver uma visão crítica, detalhista e pesquisadora, importante para obtenção do sucesso na carreira profissional.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA G. R. **Pestivirus: como eles manobram seus hospedeiros**. Universidade Federal de Goiás, Escola de veterinária e zootecnia, Programa de pós-graduação em ciência animal, Goiânia, 2011. Disponível em: <[https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011\\_Greyciele\\_Rodrigues\\_2.pdf](https://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Greyciele_Rodrigues_2.pdf)>. Acesso em: 12/04/2018.

ALMEIDA H. M. S. **Epidemiologia e prevalência de infecções pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em suínos de criações não tecnificadas**. 2015. Dissertação (mestrado em ciência animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2015.

BECHER P. et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. **Virology**, v. 311, p. 96–104, 2003.

BORDIN, L. C. **Deteção do *Mycoplasma suis* em granjas com transtornos reprodutivos**. 2012. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2012.

BORTOLOZZO, F. P. et al. Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. **Embrapa suínos e aves**, Concórdia, p. 85, 2005.

CANÁRIO R. et al. Diarreia Viral Bovina: Uma afecção multifacetada. **Veterinaria.com.pt**, v. 1, n. 2, 2009.

CIACCI-ZANELLA J. R. et al. Estudo da prevalência de anticorpos para o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) em granjas de suínos no Brasil. **Embrapa aves e suínos**, Concórdia, SC, 2002.

CLASSICAL SWINE FEVER (HOG CHOLERA). Paris: Organização mundial de saúde animal (OIE), Cartões técnicos sobre doenças, out. 2009.

DIAGNÓSTICO DO CIO E MANEJO DA COBERTURA: TAREFAS IMPORTANTES NA CRIAÇÃO. Brasília: Embrapa, a. II, n. 11, jan. 1993.

DIAS F. C. **Diarréia viral bovina (BVD): aspectos epidemiológicos da infecção persistente, avaliação sorológica da resposta imune e caracterização molecular do vírus.** 2008. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

DIETZ S. et al. Quantitative PCR analysis of shedding patterns during experimental infection by *Mycoplasma suis*. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 581-585, 2014.

DONIS R. et al. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary clinic**. Estados Unidos, v. 11, p. 393-421, 1995.

FLORES E. F. et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, Rio de Janeiro, 2005.

GERBER P. F. et al. Detection and dynamics of porcine circovirus 2 shedding in semen using conventional and real-time PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, Rio de Janeiro, 2010.

GONZÁLEZ, A. M. et al. Evaluation of long term antibody response to two inactivated bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines. **The veterinary journal**, v. 199, p. 424-428, 2014.

GROEBEL K. et al. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **American society of microbiology**, v. 77 n. 2, p. 576-584, 2009.

GROOMS D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 20, p. 5-19, 2004.

GUIMARÃES A. M. S. et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaptation to an erythrocyte niche. **Plos one**, v. 6, p. e19574, 2011A.

\_\_\_\_\_. et al. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. **Applied Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 417-425, 2011B.

HAACH V. et al. Pesquisa de circovírus suíno tipo 2 e parvovírus suíno em sêmen suíno oriundo de granja grsc. **Embrapa Suínos e Aves**, Concórdia, SC. 2016.

HOELZLE K. et al. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune response but fails to induce protection in pigs. **Vaccine**, v. 27, n. 39, p. 82, 2009.

HOELZLE L. E. et al. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 185-196, 2003.

\_\_\_\_\_. et al. Significance of haemotrophic mycoplasmas in veterinary medicine with particular regard to the *Mycoplasma suis* infection in swine. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 120, p. 34-41, 2007A.

\_\_\_\_\_. et al. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 466-474, 2007B.

\_\_\_\_\_. et al. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary microbiology**, v. 130, p. 215-226, 2007C.

\_\_\_\_\_. et al. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 202, n.1, p. 20-25, 2014.

ICTV. **Master species list**. Singapura, 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 25 mai. 2018, 15:31:17.

KIRKLAND P. D. et al. Replication of bovine viral diarrhea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **Veterinary Record**, v. 128, p. 587-590, 1991.

\_\_\_\_\_. et al. Factors influencing the development of persistent infection of cattle with pestiviruses. In: Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses, 1993, Lyon, France: European Society for Veterinary Virology, p. 117-121, 1993.

LIVESTOCK AND POULTRY. Estados Unidos: Departamento Americano de Agricultura (USDA), World markets and trade, out. 2017.

LOPES L. B. et al. Efeito do perfil sorológico para diarreia viral bovina (BVD) nas taxas de descarte em rebanhos leiteiros. **Ciência animal brasileira**, v. 11, n. 3, 2010.

MAES D. et al. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 27-38, 2016.

MASCITTI A. K. et al. Pesquisa do vírus da diarreia viral bovina em touros mantidos a campo no estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 69, n. 3, Belo Horizonte, 2017.

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

MOREIRA, F. et al. Técnicas de inseminação artificial e uso de diferentes doses inseminantes em suínos. **Science and animal health**, v. 1, n. 1, p. 50-69, 2013.

OLIVEIRA L. G. **Erradicação de focos da doença de Aujeszky em suínos no estado de São Paulo: duas estratégias de ação**. 2011. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2011.

\_\_\_\_\_. et al. Peste suína clássica: caracterização da enfermidade e ações de controle e erradicação adotadas no Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, V. 21, N. 3, 2014.

OLIVEIRA M. C. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Paulo, 2007.

PETERS I. R. et al. RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of hemoplasmas and other Mycoplasma species. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 46, p. 1873–1877, 2008

POSTEL, A. et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. **Scientific reports**, v. 6, Alemanha, 2016.

PRULLAGE J. B. et al. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 125-135, 1993.

DIAGNÓSTICO DO CIO E MANEJO DA COBERTURA: TAREFAS IMPORTANTES NA CRIAÇÃO. Brasília: Embrapa, a. II, n. 11, jan. 1993.

RELATÓRIO ANUAL. São Paulo: Associação brasileira de proteína animal (ABPA), p. 46-72, 2017.

RITZMANN M. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1-2, p. 84-91, 2009.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, v. 63, p. 514-535, 2005.

SCHREINER S. A. et al. The surface-localised  $\alpha$ -enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. **Veterinary microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 88-95, 2012.

SILVA B. M. et al. Protocolo para extração de dna genômico de anacardium giganteum. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, n. 19, 2014.

SMIT A. J. et al. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 239-249, 1999.

SOKOLI A. et al. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: New insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma. **Veterinary Research**, v. 44, p. 6-28, 2013.

STRAIT E. L. et al. Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. **Journal of the american veterinary medical association**, v. 241, p. 1666-1667, 2012.

UNESP - **Universidade Estadual Paulista**. Disponível em: <<http://www.unesp.br/portal#!/apresentacao/historico/>>. Acesso em: 21/02/2018, 09:14:34A.

\_\_\_\_\_. - **Universidade Estadual Paulista**. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/#!//instituicao/historico/>>. Acesso em: 21/02/2018, 09:32:23A.

VIEIRA, R. F. C. et al. Use of a *Mycoplasma suis*-PCR protocol for screening a population of captive peccaries (*Tayassu tajacu* and *Tayassu pecari*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 75-77, 2011.

YUAN C. L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (Eperythrozoon suis) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal Veterinary Research**, v. 7, n. 70, p. 890, 2009.

## ANEXO

**ANEXO A** – Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Laboratório de Pesquisa em Suínos na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(Unesp).

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS Campus de Jaboticabal</p>		<p>DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA HOSPITAL VETERINÁRIO “GOVERNADOR LAUDO NATEL”</p>
<p><b>CERTIFICADO DE ORIENTAÇÃO</b></p>			
<p>Conferido ao acadêmico <b>Ricardo Junio Werneck Dias Ruas</b>, aluno do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa - Câmpus Uruguaiana, pelo Estágio Curricular realizado na área de <b>Sanidade de Suínos</b>, no Laboratório de Pesquisa em Suínos - LabSui, do DCCV/FCAV/UNESP-Jaboticabal, sob orientação do <b>Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira</b>, durante o período de 19/02/2018 a 10/05/2018, perfazendo um total de 450 horas.</p>			
	<p><b>Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira</b> Orientador Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária FCAV - UNESP</p>	<p>Jaboticabal, 12 de junho de 2018.</p>	
		<p><b>Prof. Dra. Paola Castro Moraes</b> Vice-Chefe em Exercício do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária FCAV - UNESP</p>	