



Padronização da curva de quantificação *Mycoplasma hyopneumoniae* por leituras de densidade óptica em espectrofotômetro e pH

Caio Augustus Diamantino, Fernanda Simone Marks, Leonardo Teófilo Toledo, Julia Cristine

Dias Louzada, Luiz Fernando Lino de Souza, Abelardo Silva Júnior

Palavras chave: Pneumonia enzoótica, comprimento de onda, contagem

Introdução

Mycoplasma hyopneumoniae (*Mhyo*) é o causador primário da pneumonia enzoótica suína. Este se configura como um microrganismo fastidioso, de crescimento lento em meio sólido, tamanho reduzido das colônias, e não formação de turbidez em meio líquido. Isso faz com que os métodos clássicos de quantificação microbiana não sejam eficientes para este microrganismo. O padrão ouro para a quantificação de *Mhyo* é a técnica de CCU (*color changing units*) (Calus et al. (2010). Esta técnica consiste na microdiluição do isolado em placas de 96 poços e um período de incubação de 14 dias. Isto dificulta o trabalho com os isolados, pois quando o resultado de CCU é obtido, eles já passaram do seu ponto ótimo de crescimento. Já houve esforços para padronizar a quantificação por meio de espectrofotometria de massa, ensaios luminométricos e ELISA de competição, porém são técnicas laboriosas e que apresentam limitações. Sendo assim, é de suma importância a padronização de técnicas que permitam uma leitura rápida, de baixo custo e precisa, como por exemplo a utilização da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O vermelho de fenol é um indicador de pH comum que está presente na maioria dos meios de cultura, inclusive no meio Friis utilizado para o cultivo de *Mhyo*, sendo que a acidificação do meio indica que há crescimento microbiano.

Objetivos

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi estabelecer o comprimento de onda ideal para correlacionar a DO com o pH do meio, contendo *Mhyo*, a fim de estabelecer uma curva de quantificação da bactéria.

Material e Método

Para isto, foi preparado o meio Friis 1x contendo o vermelho de fenol e foram utilizados quatro isolados de *Mhyo*, sendo a Cepa J (Reino Unido), 232 (USA), UFV01 e UFV02 (Brasil). Os isolados foram reativados seguido de três passagens sucessivas, e após foram diluídos em uma proporção de 1:20 (inóculo x meio Friis) em tubos tipo falcon no volume de 50 ml. Diariamente, durante 10 dias seguidos, foi retirado uma alíquota de 4 ml, seu pH foi mensurado seguido de leitura em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 430 λ, 450 λ, 470 λ, 530 λ e 550 λ.

Os dados dos isolados foram compilados conjuntamente, totalizando 40 leituras por cada comprimento avaliado, as variáveis quantitativas foram avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos erros; e, o teste de Levene, para verificação da homogeneidade de variâncias e posteriormente submetidos ao teste de correlação de Pearson.

Resultados e Discussão

O pH médio inicial foi de 7,93 decaindo até 6,56 no dia 10. Os coeficientes de correlação foram de $R = -0,95731$ ($y = -0,4228x + 4,5551$); $-0,94233$ ($y = -0,3419x + 3,8537$); $-0,75794$ ($y = -0,1615x + 2,307$); $0,97814$ ($y = 0,6876x - 4,1292$) e $0,982991$ ($y = 1,0815x - 6,7656$), respectivamente para cada comprimento de onda testado, de acordo com a tabela 1.

Matriz das correlações		
Comprimento de Onda (λ)	Coefficiente de Correlação (R)	Equação de Correlação
430λ	-0,95731	$y = -0,4228x + 4,551$
450λ	-0,94233	$y = -0,3419x + 3,8537$
470λ	-0,75794	$y = -0,1615x + 2,307$
530λ	-0,97814	$y = 0,6876x - 4,1292$
550λ	-0,982991	$y = 1,0815x - 6,7656$

Tabela 1: Matriz das correlações entre DO e pH.

Conclusões

Apesar de todos os comprimentos de ondas apresentarem forte correlação entre as variáveis pH e densidade óptica, conclui-se que o comprimento de onda de 550 λ é o mais adequado para a aplicação da correlação entre estas duas variáveis.

Bibliografia

Calus, D., Maes, D., Vranckx, K., Villareal, I., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2010). Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *Journal of Microbiological Methods*, 83(3), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.09.001>

Apoio financeiro e Agradecimentos

