



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA E VACINAÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

MARIA DALVA BEZERRA DE ALCÂNTARA

PATOS - PB

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA E VACINAÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Autora: Maria Dalva Bezerra de Alcântara

Orientador: Prof.º Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Data da Defesa: 21/07/2010

PATOS - PB

2010

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

A347s
2010

Alcântara, Maria Dalva Bezerra de
Soroprevalência da agalaxia contagiosa e vacinação experimental
em caprinos. Alcântara, Maria Dalva B. de - Patos: CSTR/UFCG, 2010.
52p.
Inclui bibliografia.
Orientador: Edisio Oliveira de Azevedo.
Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e
Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.
1 – Epidemiologia Veterinária – Dissertação. 2. Agalaxia contagiosa -
caprino 3- Vacinas. 4 – Mastite - caprino I – Título.

CDU: 616-036.22:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

MARIA DALVA BEZERRA DE ALCÂNTARA

**SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA E VACINAÇÃO
EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovada em: 21/07/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Doutor Edisio Oliveira de Azevedo - UFCG
(Presidente - Orientador)

Prof^o Doutor - Elmiro Rosendo do Nascimento - UFF
(1^o Membro)

Prof^a Doutora - Maria das Graças Xavier de Carvalho - UFCG
(2^o Membro)

A esperança adquire-se.
Chega-se a esperança através da verdade,
Pagando o preço de repetidos esforços e de uma longa paciência.
Para encontrar a esperança é necessário ir além do desespero.
Quando chegamos ao fim da noite, encontramos a aurora.

(Georges Bernanos)

DEDICATÓRIA

Em especial ao grande formador da vida “DEUS”

A minha mãe e ao maior premio da minha vida

Meu amado e adorável esposo

Aderaldo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem agradeço todos os dias pelas obras que ELE opera em minha vida me proporcionando até hoje o dom de viver. Por todos os momentos vividos, mostrando o caminho certo e dando-me força para superar todas as dificuldades encontradas no decorrer desta caminhada.

A Aderaldo pela gratificante oportunidade de ser meu esposo.

Aos meus pais Sr. Elias (“in memoriam”) e Joana pela minha existência, pelos ensinamentos, amor, orientação e lição de vida.

As minhas irmãs, irmãos, sobrinhos e sobrinhas, pelo apoio, carinho, respeito por minha pessoa entendendo cada momento dessa caminhada;

Ao prof. Dr. Edísio Oliveira pelo apoio, orientação, paciência e amizade;

A Ana Campos pelos ensinamentos, orientação, disponibilidade do seu tempo para realização dos testes;

A todos os professores do Curso da Pós Graduação em Medicina Veterinária; A coordenadora do Curso e Direção do Campus pela ajuda financeira, professora Márcia Melo pela força e apoio laboratorial, professor Sérgio Santos pela análise estatística deste trabalho, professor Moraes pela colaboração na estatística, professora Melania pelos conselhos, professora Sara Vilar pela revisão, professora Maria das Graças, professor Ivon Tabosa e demais professores.

A todos os colegas do curso em especial a Dalana pelo apoio, companheirismo, conselhos e incentivos, Jucileide incentivadora, Gildeni pelo apoio e motivação, Tatiane, Adriana pela companhia, Allan e Silvano pela atenção.

Aos meus colegas de trabalho por realizarem tarefas que eram minhas, em especial a Aderaldo, Luciano, Neuza e os demais técnicos;

A Direção da Emepa - Estação Experimental de Pendência por me conceder os três dias semanais e que para mim foi sacrificante, mas que valeu a pena... muito obrigada;

As minhas cunhadas em especial Marizete pelo apoio e incentivo;

A todos que direta e/ou indiretamente me deram força e incentivo na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| ABSTRACT..... | 9 |
| RESUMO..... | 10 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| CAPÍTULO I – SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA EM REBANHOS LEITEIROS DO CARIRI OCIDENTAL PARAIBANO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| RESUMO..... | 16 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 2.1. Localização..... | 18 |
| 2.2. Amostragem..... | 18 |
| 2.3. Animais e Coletas..... | 19 |
| 2.4. Propriedades, rebanhos e sistema de criação..... | 19 |
| 2.5. Provas sorológicas..... | 21 |
| 3. RESULTADOS..... | 22 |
| 4. DISCUSSÕES..... | 24 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 26 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 27 |
| CAPÍTULO II - RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAPRINOS VACINADOS CONTRA AGALAXIA CONTAGIOSA..... | 33 |
| RESUMO..... | 34 |
| ABSTRACT..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 35 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 2.1. Vacinas..... | 37 |
| 2.2. Animais..... | 37 |
| 2.3. Grupos experimentais..... | 37 |
| 2.3.1. Experimento I..... | 37 |
| 2.3.2. Experimento II..... | 38 |
| 2.3.3. Desafios..... | 38 |
| 2.4. Exame clínico..... | 38 |
| 2.5. Sorologia..... | 38 |
| 2.6. Estatística..... | 39 |
| 3. RESULTADOS..... | 39 |
| 4. DISCUSSÕES..... | 43 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 45 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 49 |
| ANEXOS..... | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I – Soroprevalência da Agalaxia Contagiosa em Rebanhos Leiteiros do Cariri Ocidental Paraibano..... | 14 |
| Figura 1. Distribuição dos animais testados pelo ELISA indireto e números de amostras por municípios | 20 |
| Figura 2. Prevalência da Agalaxia Contagiosa determinada pelo ELISA indireto em municípios do Cariri Ocidental paraibano..... | 22 |
| Figura 3. Prevalência da Agalaxia Contagiosa determinada pelo ELISA indireto em propriedades do Cariri Ocidental paraibano..... | 22 |
| Figura 4. Distribuição e percentual de sinais clínicos relacionados com Agalaxia Contagiosa nos rebanhos estudados..... | 23 |
| Figura 6. Prevalência da Agalaxia Contagiosa por idade em machos avaliados pelo ELISA indireto..... | 24 |
| Figura 6- Prevalência da Agalaxia Contagiosa por idade em fêmeas avaliados pelo ELISA indireto..... | 24 |
| | |
| CAPÍTULO II – Resposta Imunológica em Caprinos Vacinados Contra Agalaxia Contagiosa..... | 33 |
| Figura 1. Média dos níveis de anticorpos em caprinos (experimento I) imunizados com vacinas aquosa e oleosa contra <i>Mycoplasma agalactiae</i> determinado pelo método ELISA indireto..... | 41 |
| Figura 2. Média dos níveis de anticorpos contra <i>Mycoplasma agalactiae</i> em caprinos (experimento II) imunizados com vacina aquosa e oleosa determinado pelo ELISA indireto..... | 42 |

SEROPREVALENCE OF CONTAGIOUS AGALACTIA AND VACCINATION EXPERIMENTAL IN GOATS

ABSTRACT

Two studies were conducted to determine the prevalence of contagious agalactia and evaluate the immune response in goats vaccinated. The prevalence was performed in 544 blood serum samples obtained from 20 dairy herds distributed in seven counties of western microrregion Cariri Paraiba for detecting antibodies to *Mycoplasma agalactiae* by ELISA. For bacterial isolation, 62 milk samples were collected from animals with mastitis and seeded in medium Haykirk modified. Of the 544 samples, 307 (56.43%) showed positive results in serology. The rate of seropositive animals ranged from 10.0% to 100% by property. There was no isolation of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples cultured. The animals immunized with vaccine containing oil adjuvant showed statistically significant levels of antibodies ($p < 0.05$) and persistent when compared to animals vaccinated with the aqueous vaccine. It can be concluded that the contagious agalactia is disseminated in the microrregion and the use of oily vaccine stimulates the production of antibodies against *Mycoplasma agalactiae*.

Keywords: Antibodies, Immunity, Vaccines.

SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA E VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS

RESUMO

Foram realizados dois estudos para determinar a prevalência de Agalaxia Contagiosa e avaliar a resposta imunológica em caprinos vacinados. A prevalência foi realizada em 544 amostras de soro sanguíneo obtida em 20 rebanhos leiteiros distribuídos em sete municípios da microrregião do Cariri ocidental paraibano para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* através de ELISA indireto. Para isolamento bacteriano, 62 amostras de leite foram coletadas de animais com mastite e semeadas em meio Hayflick modificado. Das 544 amostras, 307 (56,43%) apresentaram resultados positivos na sorologia. A taxa de animais sororreagentes variou de 10,0% a 100% por propriedade. Não houve isolamento de *Mycoplasma agalactiae* nas amostras de leite cultivadas. Os animais imunizados com vacina contendo adjuvante oleoso apresentaram níveis de anticorpos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e persistentes quando comparados aos animais vacinados com a vacina aquosa. Pode-se concluir que a agalaxia contagiosa está disseminada na microrregião e a utilização de vacina oleosa estimula a produção de anticorpos contra *Mycoplasma agalactiae*.

Palavras-chave: Anticorpos, Imunidade, Vacinas.

INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura é uma atividade explorada em todos os continentes, com expressão econômica em alguns países, com relativa produtividade e rentabilidade. No Brasil, o rebanho caprino soma 13 milhões de cabeças, representando 2,1% do efetivo mundial. Na região Nordeste concentra-se aproximadamente 91% do rebanho nacional. A Paraíba possui um rebanho de 653.730 cabeças, sendo a Mesorregião da Borborema a maior produtora do Estado, com 52,33% do efetivo caprino. Nesta Mesorregião, a microrregião do Cariri Ocidental destaca-se com um efetivo de 210.735 cabeças, dos quais cerca de 25% são animais de aptidão leiteira (IBGE 2006). A produção diária de leite caprino no estado gira em torno de 20 mil litros, o que representa uma escala de produção capaz de atrair criadores para participar desta atividade. (Paulo Galvão, Comunicação pessoal).

Atualmente a Paraíba é o maior produtor de leite caprino no Brasil. Desta produção, os programas governamentais, estadual e federal (Leite da Paraíba, Fome Zero, Programa de Aquisição de Alimentos – PAA) absorvem em torno de 15 mil litros de leite por dia. Conforme relato do SEBRAE (2008), a microrregião do Cariri concentra 70% do volume de produção diária do leite de cabra do Estado. À medida que se aumenta o incentivo para ampliação desta atividade, através do melhoramento genético de caprinos, intensificação do sistema de produção, maior fluxo de animais entre rebanhos, circulação de reprodutores entre os estabelecimentos de criação, participação em eventos agropecuários, entre outros, aumenta-se o risco de transmissão de enfermidades, em especial as de caráter infeccioso.

Independente destes fatores, a adoção de programas de sanidade é incipiente no Estado, favorecendo a introdução de microrganismos exóticos, como o vírus da Artrite encefalite caprina, a *Brucella ovis*, *Mycoplasma* spp e a disseminação dessas enfermidades entre os rebanhos. Segundo Brown (2001), o surgimento de doenças emergentes está relacionado com o aumento de movimentação de pessoas e animais, modificações no meio ambiente, ocorrências de doenças que podem afetar mais de uma espécie e as transformações tecnológicas nos sistemas de produção.

*Paulo Galvão (Consultor do Sebrae – PB)

A Agalaxia contagiosa (AC) é uma enfermidade importante da caprinocultura brasileira e mundial, sendo motivo de preocupação para pesquisadores e produtores, uma vez

que as perdas econômicas são relevantes em consequência da mortalidade de animais, perda progressiva de peso, queda na produção de leite, agalaxia, poliartrite, ceratoconjuntivites, pneumonias, e, principalmente o sacrifício precoce de animais com artrite crônica e recidiva da enfermidade. Levando-se em consideração a realidade sócio-econômica e o tipo de exploração zootécnica predominante no Nordeste, a presença de *Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos representa um risco de disseminação para os rebanhos nativos. O manejo preventivo é de fundamental importância, especificamente em rebanhos leiteiros já estabelecidos e principalmente quando da compra e/ou empréstimos de animais, que deverão ser mantidos em quarentena e realizados a sorologia prévia, para posteriormente, serem incorporados ao rebanho.

Em áreas endêmicas, diversas estratégias de prevenção têm sido usadas para minimizar a ocorrência clínica da agalaxia contagiosa, incluindo antibioticoterapia, abate/sacrifício ou vacinação, pois o controle é de fundamental importância para reduzir a disseminação intra e inter-rebanhos (Bergonier et al. 1997). As estratégias de vacinação contra AC, especificamente contra *M. agalactiae*, estão baseadas em vacinas vivas atenuadas ou inativadas (Foggie et al. 1971a, Léon-Vizcaino et al. 1995, Buonavoglia et al. 1998, Tola et al. 1999) e sua eficácia tem sido avaliada em várias ocasiões (Hasso et al. 1993, Greco et al. 2002).

As vacinas vivas atenuadas de *M. agalactiae*, são mais efetivas que as vacinas inativadas, pois protegem melhor contra a infecção clínica, mas requer doses elevadas. Em contrapartida, seu uso não é permitido em países onde a AC ocorre endemicamente. Se usadas como prevenção nos animais sadios, não apresentam infecção generalizada nem sinais clínicos, mas pode surgir infecção temporária do úbere (Madanat et al. 2001). As vacinas inativadas não apresentam esta desvantagem, mas a resposta imune produzida é baixa e em condições de campo são pouco utilizadas. Por induzirem títulos de anticorpos baixos e menos persistente, devem ser repetidas em períodos mais curtos, preferencialmente antes e após o parto (Léon-Vizcaino et al. 1995). O uso de vacinas preparadas com amostras isoladas na região é uma das estratégias para o controle da agalaxia contagiosa.

A Agalaxia contagiosa foi diagnosticada na microrregião do Cariri paraibano em 2002 e desde então a doença vem disseminando-se para outras microrregiões do Estado, causando importante impacto econômico na caprinocultura leiteira local. Trabalhos de pesquisa realizados na Paraíba indicam que a infecção estava presente em aproximadamente

20% dos rebanhos no período entre 2004 e 2005 (Bandeira et al. 2008) e com possibilidade de disseminar-se para outras regiões caso medidas de controle não fossem adotadas (Azevedo et al. 2006). Em busca de alternativas para esse controle, Marinho (2008) desenvolveu um produto bioterápico para o tratamento de AC a partir de *M. agalactiae* isolado de caprino naturalmente infectado e Campos et al (2009) padronizou um ELISA indireto para o diagnóstico sorológico, reduzindo o tempo de diagnóstico, o que pode viabilizar o controle de trânsito de animais. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo estimar a soroprevalência da AC e avaliar a resposta imune à vacinação experimental com vacinas importadas.

REFERÊNCIAS

- Azevedo E.O., Alcântara, M.D.B., Nascimento E.R., Tabosa I.M., Bareto M.L., Almeida J.F., Araújo M.D., Rodrigues A.R.O., Riet-Correa F., Castro R.S. 2006. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. Braz. J. Microbiol., v. 37, p. 576-581. In.: IOM.
- Bandeira D.A., Castro R.R., Azevedo E.O., Nascimento E.R., Melo L.S.S. 2008. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V.60 n.5, Belo Horizonte. Oct. 2008.
- Bergonier D., Berthelot X., Poumarat F. 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. Dec; 16 (3):848 – 73 I.
- Brown C. 2001. La importancia de las enfermedades emergentes para la sanidad animal, La salud pública y El comercio.
- Buonavoglia D. Fasanella A., Sagazio P., Tempesta M., Iovane G., Buonavoglia C. 1998. Persistent of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. The microbiologica ISSN 1121-7138, 1998. v.21, n.º 2, p. 209-212

- Foggie A., Etheridge J.R., Edgard O., Arisoy F. (1971a). Contagious agalactia of sheep and goats studies on live dead vaccines in lacting sheep. *Journal of comparative pathology* 81, 165-172.
- Greco G., Corrente M., Buonavoglia D., Aliberti A., Fasanella A. 2002. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *The microbiologica* ISSN 1121-7138. v.25, n.º 1, p. 17-20.
- Hasso S. A., Al-aubaidi J. M., Al-Darraji A. M. 1993: Contagious agalactia in goats: its severity as related to the route of infection and pregnancy. *Small Ruminants Res.* 10: 263 – 275.
- IBGE 2006. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estatística/economia/ppm2006>. Acesso em Dez. 2009.
- Léon-Vizcaino L., Garrido–Abellan F., Cubero-Pablo M. J., Perales A. 1995: Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. *Vet. Rec.* 137: 266 – 269.
- Madanat A., Zendulková D., Pospíšil Z. 2001. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet. Brno.* v. 70, p. 403-412.
- Marinho M.L. 2008. Ação terapêutica do bioterapico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos (*Capra hircus*, linnaeus, 1758) com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, p123 (Tese de Doutorado).
- SEBRAE – PB. Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas da Paraíba. Paraíba lidera produção de leite de cabra no país. João Pessoa 2008. Disponível em www.sebraepb.com.br/noticias. Acesso em Junho 2008.
- Tola S., Manunta D., Rocca S., Mocchigiani A.M., Indini G., Angioi P.P., Leori G. 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine*, 17: 2764-2768.

CAPITULO I

Soroprevalência da agalaxia contagiosa em rebanhos leiteiros do
Cariri Ocidental paraibano

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da Pesquisa Veterinária Brasileira de acordo com o que estabelece a Norma nº 01/2007 de 09 de Abril de 2007, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.

**SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA EM REBANHOS
LEITEIROS DO CARIRI OCIDENTAL PARAIBANO**

Maria Dalva Bezerra de Alcântara, Edisio Oliveira de Azevedo*, Ana Cláudia Campos,
Sérgio Santos de Azevedo, Elmiro Rosendo do Nascimento, Roberto S. Castro, Aderaldo
Alcântara de Farias, Gildeni Maria de Aguiar.

ABSTRACT.- Alcântara M.D.B., Azevedo E.O., Campos A.C., Azevedo S.S., Nascimento E.R., Castro R.S., Farias A.A., & Aguiar G.M., 2010. (**Seroprevalence of contagious agalactia in dairy herds of west Cariri paraiban.**) **Soroprevalência da agalaxia contagiosa em rebanhos leiteiros do Cariri Ocidental paraibano.** _ *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Caixa Postal 23851-970, Embrapa-CNPAB/PSA Km 47 - Seropédica, Rio de Janeiro RJ. Brasil, E-mail: edisio@cstr.ufcg.edu.br

The objective of this work was to investigate the presence of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* by ELISA and isolate the agent through the cultivation of milk in herds of dairy goats Cariri Western State of Paraíba. It had been collected and analyzed 544 serum samples and 62 samples of milk obtained from goats aged between eight months and five years, belonging to 20 farms distributed in municipalities covered in this study. The culture of milk was performed in modified Hayflick liquid and solid medium. Antibodies against *Mycoplasma agalactiae* was detected in 56.43% (307/544) of samples. The prevalence among properties ranged from 10% to 100%. There was no growth in cultures using the agent.

INDEX TERMS: Goat, *Mycoplasma agalactiae*, indirect ELISA, mastitis.

Recebido em

Aceito para publicação em

*Universidade Federal de Campina Grande, Av Universitária, Santa Cecília, Patos-PB, Cep: 58708-110, Caixa Postal 64 - FONE: (083) 3511-3000 - FAX: (083) 3511-3009

Autor para correspondência: edisio@cstr.ufcg.edu.br

RESUMO. - Objetivou-se com este trabalho, investigar a presença de anticorpos contra *Mycoplasma agalactiae* pelo ELISA indireto e isolar o agente através do cultivo do leite em rebanhos de caprinos leiteiros do Cariri Ocidental do Estado da Paraíba. Para tanto, foram coletadas e analisadas 544 amostras de soros e 62 amostras de leite obtidas de caprinos com idade entre oito e sessenta meses, pertencentes a 20 criatórios distribuídos nos municípios escolhidos para este estudo. O cultivo do leite foi realizado em meio Hayflick modificado, sólido e líquido. Anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* foi detectado em 56,43% (307/544) das amostras. A prevalência entre propriedades variou de 10% a 100%. Não houve crescimento do agente nos cultivos realizados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Caprina, *Mycoplasma agalactiae*, Elisa indireto, Mastite.

INTRODUÇÃO

Agalaxia contagiosa (AC) é uma doença contagiosa dos ovinos e caprinos de distribuição mundial e endêmica nos países da costa Mediterrânea, uma das principais regiões produtoras de leite caprino mundial (Astorga et al. 2000). Agalaxia contagiosa é uma doença de notificação obrigatória a OIE (Organização Internacional de Epizootias) e oficialmente ocorre em todos os continentes (OIE 2010). A doença pode causar mastite, agalaxia, poliartrite, ceratoconjuntivite e, ocasionalmente, aborto e pneumonia. O principal agente da AC é *Mycoplasma agalactiae*, embora *M. capricolum* subsp *capricolum*, *M. mycoides* subsp *mycoides* (Colônia grande), *M. putrefaciens* e *M. mycoides* subsp *capri* também podem causar a doença (Gil et al. 2003, Madanat et al. 2002).

A Agalaxia contagiosa acomete ovinos e caprinos independentemente do sexo. Nas fêmeas, a doença ocorre com maior frequência logo após o parto quando a glândula mamária está em intensa atividade funcional. No Brasil, há relato de isolamento de micoplasmas em

animais com distúrbios respiratórios, reprodutivos, mastite, agalaxia e ceratoconjuntivite (Penha & D'Apice 1942, Nascimento et al. 2002, Azevedo et al. 2003, Almeida Neto et al. 2004) e em animais assintomáticos (Ribeiro et al. 1995, Muller et al. 1998). A transmissão se dá pelo contato com animais infectados, com ou sem sinais clínicos, ingestão de alimentos contaminados com secreções ou leite. A via de contágio mais comum entre animais do mesmo rebanho é a dígestória nos lactantes, porém as fêmeas em lactação adquirem a infecção via galactófora ascendente ou através das mãos do ordenhador, ordenhadeira mecânica, contato com materiais contaminados (cocho, bebedouros, solo, entre outros) e por inalação. A venda de animais portadores e o contato entre os animais durante o deslocamento entre rebanhos constituem fatores de risco para a disseminação da enfermidade (Bergonier & Poumart 1996, Astorga et al. 2000, Madanat et al. 2001).

A Agalaxia contagiosa foi diagnosticada na microrregião do Cariri paraibano em 2002 e desde então, a doença vem disseminando-se para outras microrregiões do Estado, causando importante impacto econômico na caprinocultura leiteira local, uma vez que esta é a principal região produtora de leite caprino do Brasil e representa uma importante fonte de renda para os agricultores familiares da região. Nesse contexto, objetivou-se estimar a soroprevalência da agalaxia contagiosa em rebanhos leiteiros do Cariri Ocidental paraibano.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na microrregião do Cariri Ocidental do Estado da Paraíba, distante 286 km da capital do Estado, com uma área demográfica de 6.983,601 km², com as seguintes coordenadas geográficas, 7° 12' 23" de latitude Sul e 36° 49' 25" de longitude Oeste, uma altitude de 500 m do nível do mar, com precipitação anual de 300 a 800mm e temperatura média de 24 a 32°C.

Para estimativa da prevalência da agalaxia contagiosa e sua distribuição nos rebanhos, o tamanho da amostra e o número de propriedades inseridas neste estudo, foi determinada, utilizando-se a fórmula recomendada por Thrusfield (2004).

$$n = \frac{p \cdot q \cdot z^2}{d^2}$$

Onde:

p = prevalência estimada

q = 1 - p

z = Intervalo de confiança (1,96)

d = erro amostral

Assim, estimando-se a prevalência em 15% e o erro amostral de 3% obteve-se: n = 544 amostras.

Foram selecionadas 20 propriedades produtoras de leite de cabras, cujos proprietários faziam parte das Associações de Criadores de Caprinos. O número de amostras por município está representado na figura 1. O número de amostras obtidas no município de Monteiro (219), foi superior aos demais em função do maior número de produtores cadastrado em Associações, por ser o maior produtor de leite e por possuir mini-usina que concentra boa parte da produção de leite da microrregião, além de ser um município que promove vários eventos agropecuários com participação de produtores da região.

Amostras de sangue de 544 caprinos, sendo 512 fêmeas e 32 machos, com idade entre 8-60 meses, com e sem sinais clínicos da enfermidade foram obtidas por punção da veia jugular utilizando sistema de coleta a vácuo. Os tubos foram centrifugados e os soros transferidos para microtubos e armazenados a -20°C até a realização dos testes.

Amostras de leite provenientes de 62 cabras em lactação apresentando alterações mamárias foram coletadas para isolamento de *M. agalactiae*. As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaios estéreis contendo solução salina glicerinada a 50% adicionada de Penicilina (2000UI/ml) e armazenadas a -20°C até a realização dos cultivos.

Todas as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Vacinas e Diagnóstico (LAVADI) da Universidade Federal de Campina Grande. Estas amostras foram coletadas no período de março a agosto de 2005, quando a enfermidade estava instalada na região.

Dados clínicos e informações sobre tipo de criação, manejo sanitário, ordenha, origem dos animais, entre outras, foram obtidos através de exame clínico dos animais e aplicação de um roteiro semiestruturado, aos criadores e/ou manejadores para caracterização dos sistemas produtivos.

Para detecção de anticorpos anti- *M. agalactiae* foi utilizado um ELISA indireto descrito por Campos et al (2009). As placas foram lavadas com água destilada, sensibilizadas com o antígeno e incubadas em câmara úmida “overnight” a 37° C. Após, lavadas três vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (v/v) (PBS-T) e as placas bloqueadas pela adição de 2% de BSA em PBS por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Fez-se mais três lavagens com PBS-T e 100µL das amostras de soros diluídas em PBS contendo 2% de leite em pó desnatado e 10mM de EDTA (p/v) foram distribuídas em cada poço e as placas incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Realizou-se lavagem com PBS-T. O total de 100µL do conjugado de proteína G-peroxidase diluído 1:90.000 foi distribuído por poço e as placas incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100µL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,1mg/ml de 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio (v/v). Após 15 minutos, a reação foi bloqueada com 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada com filtro de 450nm.

Os cultivos foram realizados em meio Hayflick modificado como descrito por Azevedo (2005) em todas as amostras de leite dos animais que apresentaram alterações no leite (grumos, pus, coloração escura). Inicialmente 80µl de leite foram semeados em meio

sólido, as placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C e observadas diariamente em microscópio estereoscópico com aumento de 80 a 120 vezes. Quando colônias sugestivas de *Mycoplasma* spp eram observadas, fragmentos do agar foram recortados e transferidos para tubos contendo meio líquido, incubados a 37°C por 72 horas e posteriormente repicados para meio sólido e novamente cultivados como descrito anteriormente.

RESULTADOS

Os rebanhos eram constituídos de animais puros (Saanen e Toggenburg) e/ou mestiços destas raças em cruzamentos com Parda Alpina ou Anglo-Nubiano, com ou sem sinais clínicos de artrite, ceratites, ceratoconjuntivite e mastite em diferentes estágios de lactação, criados em regime semi-intensivo, ordenhados manualmente.

Das 544 amostras de soro testadas, 307 (56,43%) apresentaram anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae*. Todas as propriedades estudadas apresentaram pelo menos um animal sororreagente. Os resultados por municípios e propriedades estão demonstrados nas Figuras 2 e 3.

Os sinais clínicos de agalaxia contagiosa foram identificados pelos criadores e verificados *in locu* quando da aplicação dos questionários. A mastite foi o sinal clínico predominante, registrado em 38 (77,5%) dos 49 animais que apresentaram alguma alteração relacionada com agalaxia contagiosa, seguido da artrite, observado em 12,24% dos animais, como demonstrado na Figura 4.

Dentre os 49 animais com sinais, 40 (81,6%) apresentaram resultados positivos no ELISA indireto e estavam distribuídos em todos os municípios pesquisados. Das 20 propriedades estudadas, 13 (65%) apresentaram animais com sinais clínicos de agalaxia contagiosa. A prevalência sorológica da agalaxia contagiosa foi observada em todos os

animais independentemente da idade e sexo (Figuras 5 e 6). Não foram observadas diferenças significativas quanto ao sexo e a idade ($p>0,05$).

Todas as amostras de leite submetidas ao cultivo foram negativas para a presença de *M. agalactiae*.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indica que a prevalência da agalaxia contagiosa está crescendo na microrregião, visto que Campos et al. (2009) identificaram 83,28% de prevalência em 317 amostras de soro caprino. No presente estudo, os soros estavam armazenados desde 2005.

Em outros países, a prevalência de AC tem sido relatada. Al-Momani et al. (2006) em estudo realizado na Jordânia, descreveram prevalência de 39% e 36% para ovinos e caprinos, respectivamente. Os autores relatam ainda que quando estas espécies são criadas conjuntamente, a soropositividade foi de 43%. Na Espanha, há relatos de 40%, 55% e 66% de prevalência de *Micoplasma agalactiae* em caprinos (De La Fe et al. 2005, Assunção et al. 2004).

A ausência de *M. agalactiae* nas 62 amostras de leite cultivadas pode estar relacionada com o tratamento rotineiro de mastites utilizado pelos criadores que já conhecem os efeitos desta enfermidade. Nardelli (2008) relata a grande presença de resíduos de antibióticos no leite de cabras enviados para as mini-usinas que processam este produto na região do Cariri do Estado da Paraíba. O consumo de leite contendo resíduos de antibióticos implica na possibilidade de desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas nos indivíduos sensíveis a este tipo de droga, especialmente em crianças, devendo ser motivo de preocupação das

autoridades de saúde pública, como também para a indústria de laticínios devido às alterações nos processos de fermentação dos produtos lácteos (Brito & Lange 2005).

Deve-se estar atento também para o fato que outros microrganismos estão envolvidos nas infecções da glândula mamária e eventualmente, podem causar sinais clínicos semelhantes da agalaxia contagiosa, como por exemplo, *Streptococcus agalactiae* (Cremonesi et al. 2009).

Outra possibilidade é o longo período (quatro anos) que as amostras ficaram armazenadas, inviabilizando o crescimento de *M. agalactiae*, embora Almeida et al. (2007) tenham obtido crescimento deste microrganismo após dois anos de armazenamento a -20°C em glicerol. A realização de técnicas moleculares, como a PCR poderá esclarecer a presença deste microrganismo nessas amostras.

Tola et al. (1997), observaram que a acidificação progressiva do leite é um dos fatores limitantes para o crescimento de *Mycoplasma spp* em meios de cultura, enquanto uma alta percentagem de bactérias cresceria em meio Agar seletivo, prejudicando a identificação de colônias de micoplasmas.

Resultados diferentes dos obtidos neste estudo são apresentados por Contreras et al. (1995) e Egwu et al. (2001) que detectaram infecções por *Mycoplasma spp*. em amostras de leite obtidas de cabras com e sem mastite. Miranda-Morales (2000) em estudo realizado na Região da Murcia – Espanha observou que 40% (12/30) dos rebanhos pesquisados apresentaram resultados positivos na cultura. Detecção de micoplasmas foi relatada por De La Fe et al. (2005), Al-Momani et al. (2006) e Azevedo et al. (2006), em casos de mastite clínica e subclínica. Em todos estes trabalhos, não há informações sobre o tempo de armazenamento ou se os animais eram ou não tratados no momento das coletas das amostras.

CONCLUSÕES

A presença de anticorpos nas amostras analisadas indica que a infecção por *M. agalactiae* está disseminada na microrregião do Cariri Ocidental do Estado da Paraíba.

O ELISA indireto é uma ferramenta que deve ser empregada como técnica para controle de trânsito de animais.

Amostras de leite conservadas por mais de quatro anos, não é adequada para realização de cultivo para isolamento de *Mycoplasma agalactiae*.

Agradecimentos: A Ana Cláudia Campos (doutoranda da UFRPE) pelo fornecimento do antígeno para realização dos testes sorológicos. Ao professor Edisio Oliveira de Azevedo por suas orientações e a EMEPA (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba) pela minha liberação para realizar o curso de Pós-graduação da UFCG.

REFERÊNCIAS

- Al-Momani W., Halablab M.A., Abo-Shehada M.N., Miles K., McAuliffe L., Nicholas R.A.J. 2006. Isolation and molecular identification of small ruminant micoplasmas in Jordan. *Small Ruminants Research*, v.65, p.106-112.
- Almeida Neto J.B., Sá F.B., Buzinhani M., Timenetsky J., Mota R.A., Almeida M.Z. 2004. Ocorrência de *Mycoplasma Conjunctivae* em ovinos sadios e com Ceratoconjuntivite Infecciosa no Estado de Pernambuco *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.1, p.79-81.
- Almeida J.F., Nascimento E.R., Pereira V.L., Barreto M.L., Campos A.C.M., Azevedo E.O. 2007. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) no diagnóstico de micoplasmoses caprina a partir de cultivos estocados em glicerina. *Rev. Bras. de Med. Vet.* v.29, n.2.

- Astorga R., Gomez-Vallamandos J. C., Arenas A., Salguero F. J., Tarradas C., Martín M. P., Romanin S. y Perea A. 2000. Patologia de los pequeños rumiantes. Síndromes de mortalidad perinatal y mamitis-agalaxia. Disponível em: <http://www.colvet.es/infovet/>. Acesso em Dezembro de 2009.
- Assunção P., De La Fe C., Ramirez A.S., Andrada M., Poveda J.B. 2004. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Cahary Islands. Vet. Rec. 154: 257-259.
- Azevedo E.O., Castro, R.S., Tabosa, I.M., Almeida, V.M., Santos, L.P., Bandeira, D.A., Araújo, M.D., Almeida, J.F., Nascimento, E.R., 2003. Comportamento da agalaxia contagiosa em caprinos e ovinos no nordeste brasileiro. In: Congresso Latinoamericano de Buiatria, XI, Salvador, p.71.
- Azevedo E.O. Aspectos clínicos, microbiológicos, anatomo-patológicos e epidemiológicos da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) no Brasil. 2005. 135p Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.
- Azevedo E.O., Alcântara, M.D.B., Nascimento E.R., Tabosa I.M., Bareto M.L., Almeida J.F., Araújo M.D., Rodrigues A.R.O., Riet-Correa F., Castro R.S. 2006. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. Braz. J. Microbiol., v. 37, p. 576-581. In.: IOM
- Bergonier D. & Poumart F. 1996. Agalaxia contagiosa de los pequeños rumiantes: epidemiologia, diagnóstico y control. Ver. Sci. Tech. Off Int. Epiz., 15 (4), 1431-1476.
- Brito M.A.V.P & Lange C.C. 2005. Resíduos de antibióticos no leite. ISSN 1678-3123 Juiz de Fora. (Embrapa Gado de leite Comunicado Técnico 44), p.4.
- Campos A.C., Teles J.A.A., Azevedo E.O., Nascimento E.R., Oliveira M.M.M., Nascimento S.A., Castro R.S. 2009. ELISA protein G for the diagnostic of contagious agalactia in small ruminants. Small Ruminants Research 84 70-75

- Contreras A., Corrales J.C., Sierra D., Marco J. 1995. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminants Research*. V.17, p.71-78.
- Cremonesi P., Pisoni G., Severgnini M., Consolandi C., Moroni P., Raschetti M., Castiglioni B. 2009. Pathogen detection in Milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method. *J. Dairy Sci.* 92:3027-3039
- De La Fe C., Assunção P., Antunes T., Rosales R.S., Poveda J.B. 2005. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. *The Veterinary Journal*, v. 170, p. 257-259.
- Egwu G.O., Ameh J.A., Aliyu M.M., Mohammed F.D. 2001. Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. *Small Rum. Res.* n. 39, p. 87-91.
- Gil M.C.; Peña F.J., Mendoza J.H., Gomez L. 2003. Genital lesions in an Outbreak of Caprine Contagious Agalactia Caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. Series B.*, v. 50, n. 10, p. 484.
- Madanat A., Zendulková D., Pospíšil Z. 2001. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet. Brno.* v. 70, p. 403-412.
- Madanat A., Zendulková D., Lány P., Pospíšil Z., Cihal P. 2002. Prevalence of *Mycoplasma agalactiae* Antibodies in Czech and Jordanian Herds of Small Ruminants. *Acta Vet. Brno.* 71: 37-44
- Miranda-Morales, R.E., Luengo Retamosa, C., Garcia Muñoz, D.; Jimenez Mateo, J. Y Contreras de Vera, A. 2000. Seguimiento de la infección por micoplasma en leche de tanque de explotaciones caprina. *Patología Animal*, – XXV: Comunicación 8.

- Muller E.E., Nascimento E.R., Mettifogo E., Reis A.C.F., Freitas J.C., Nascimento M.G.F. 1998. Isolamento de *Mycoplasma arginini* e *Actinomyces pyogenes* de ovino com pleuropneumonia. Rev. Bras. Med. Vet. v. 20, n. 3 p. 118-119.
- Nascimento E.R., Barreto M.L., Platenik M.O., Azevedo E.O., Tabosa I.M., Alcântara M.D.B., Almeida J.F., Nascimento M.G.F. 2002. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: Intern. Cong. Organiz. Mycoplasmol, (IOM). XIV, Vienna, p.45-46.
- Nardeli M.J. 2008. Resíduos de antimicrobianos e suas causas no leite de cabra *in natura* produzido em municípios do semi-árido paraibano. 117p. (Dissertação de Mestrado).
- OIE 2010. Disponível: http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=50&c_cont=6. Acesso em 23 de agosto 2010.
- Penha A.M. & D'apice M. 1942. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. Arq. Inst. Biol., 13:299-301.
- Ribeiro V.R., Nascimento E.R.; Faccini J.L.H., Nascimento M.G.F., Lignon G.B. 1995. Ocorrência de micoplasmas em caprinos através da técnica de
- Thrusfield M. Epidemiologia Veterinária. Roca ed., 2 ed. São Paulo, 2004. 556p.
- Tola S., Angioi A., Rocchigiani A.M., Indini G., Manunta D., Galleri G., Leori, G. 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reacton. *Veterinary Microbiology*, v.54, p.17-22.

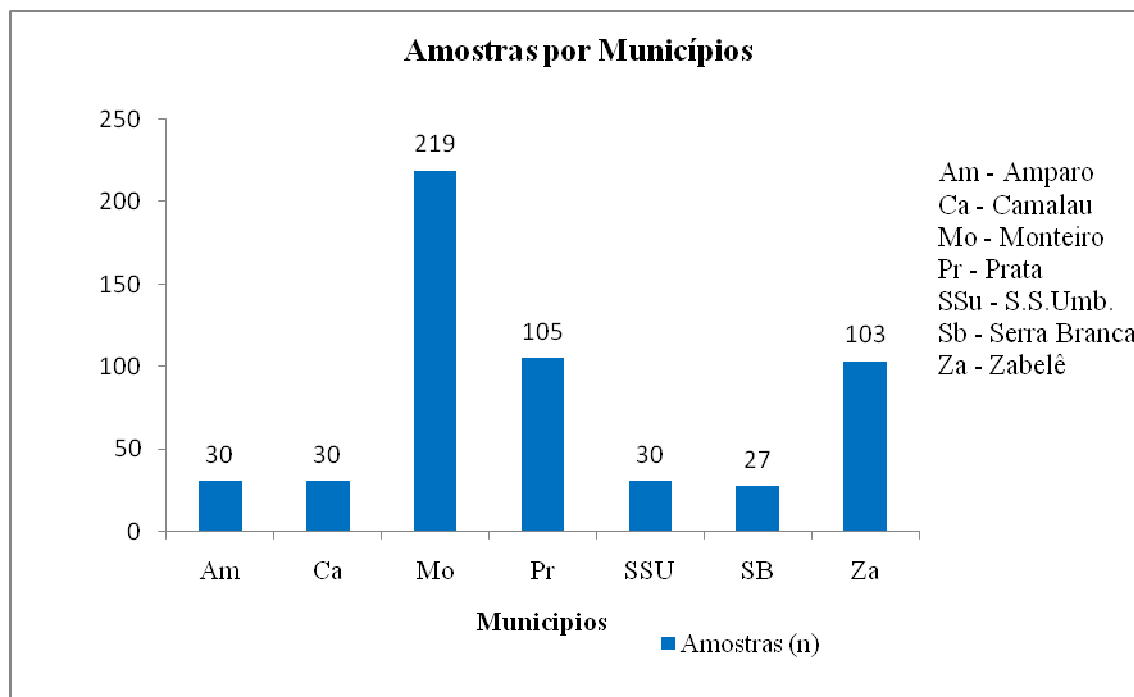


Figura 1. Distribuição de animais por municípios.

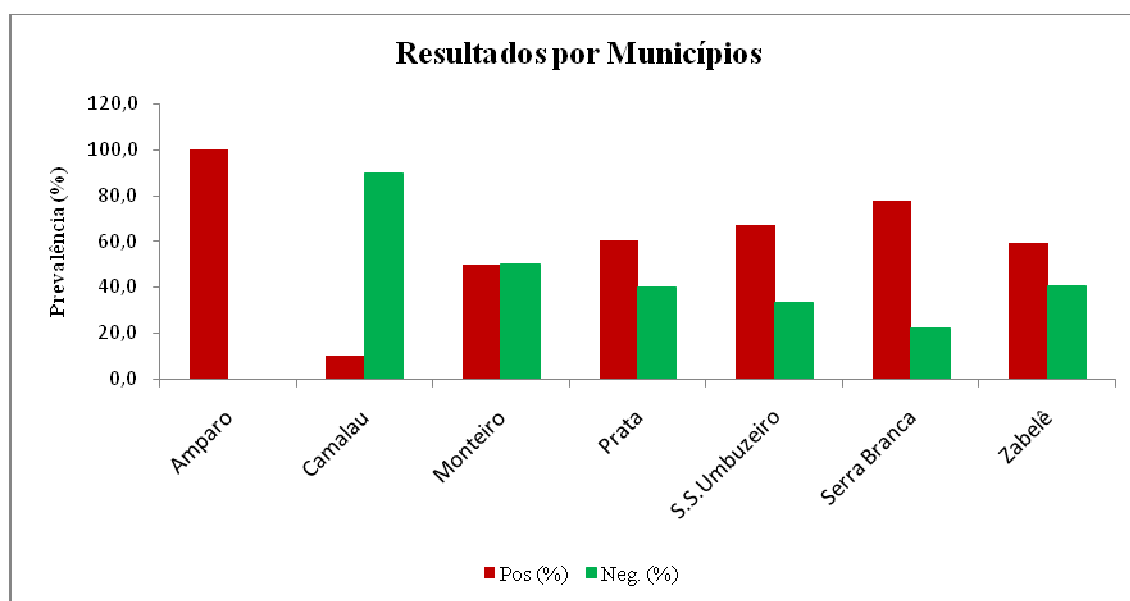


Figura 2. Prevalência da Agalaxia contagiosa determinada pelo ELISA indireto em municípios do Cariri Ocidental paraibano.

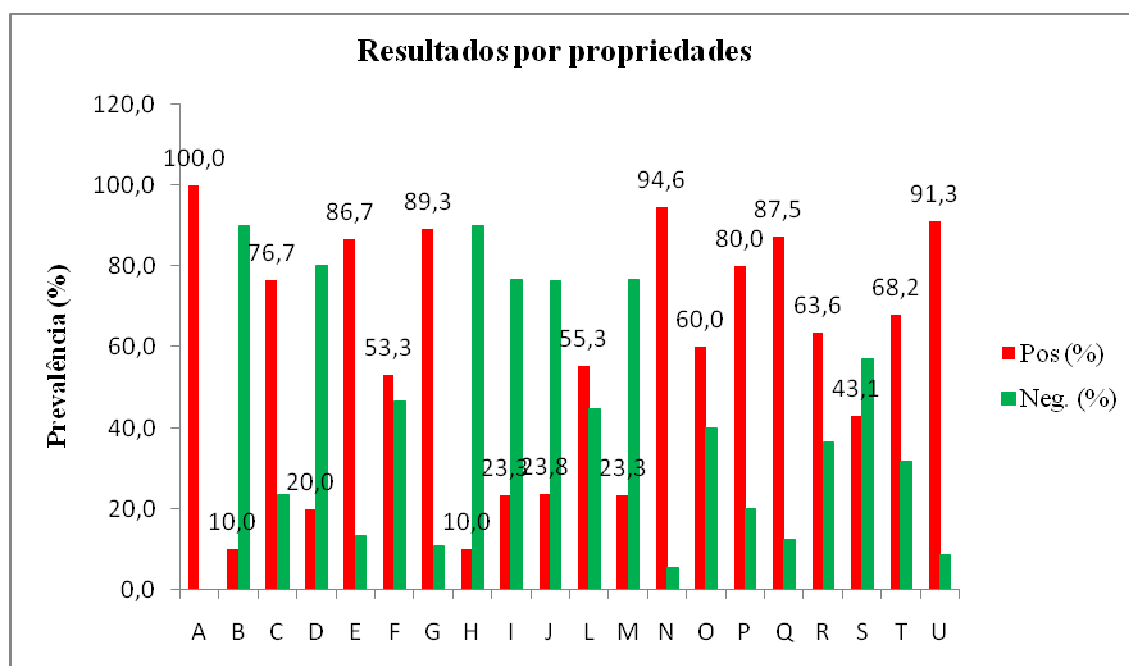


Figura 3. Prevalência da Agalaxia contagiosa determinada por ELISA indireto em propriedades do Cariri Ocidental paraibano.

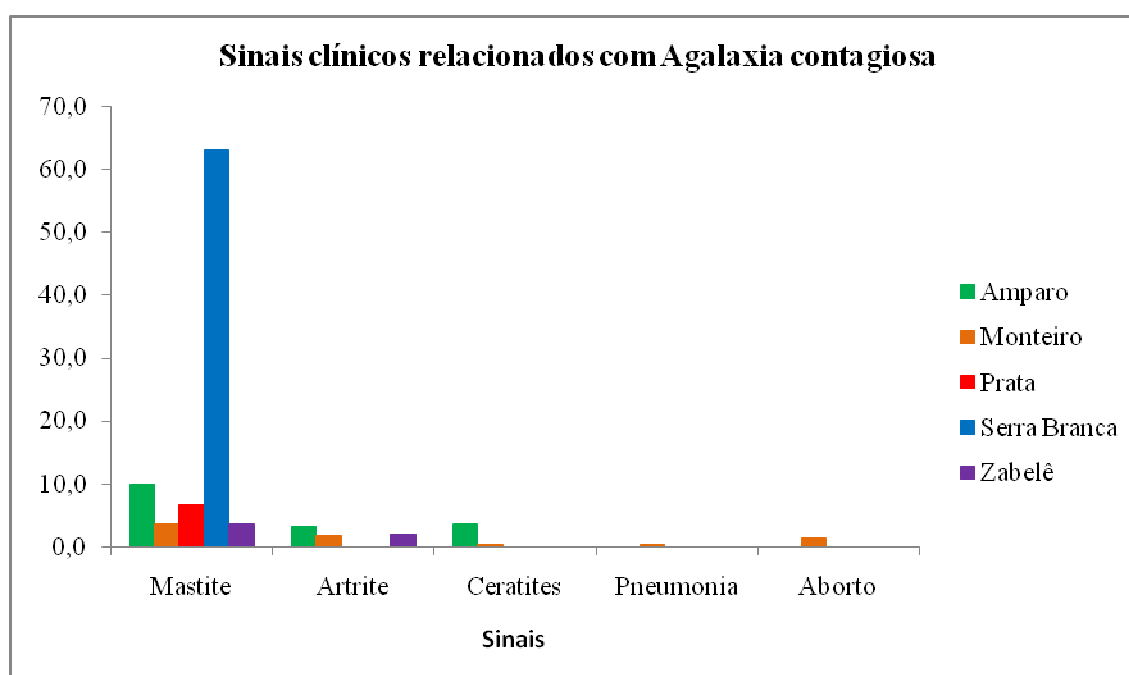


Figura 4. Distribuição e percentual de sinais clínicos relacionados com Agalaxia contagiosa nos rebanhos estudados.

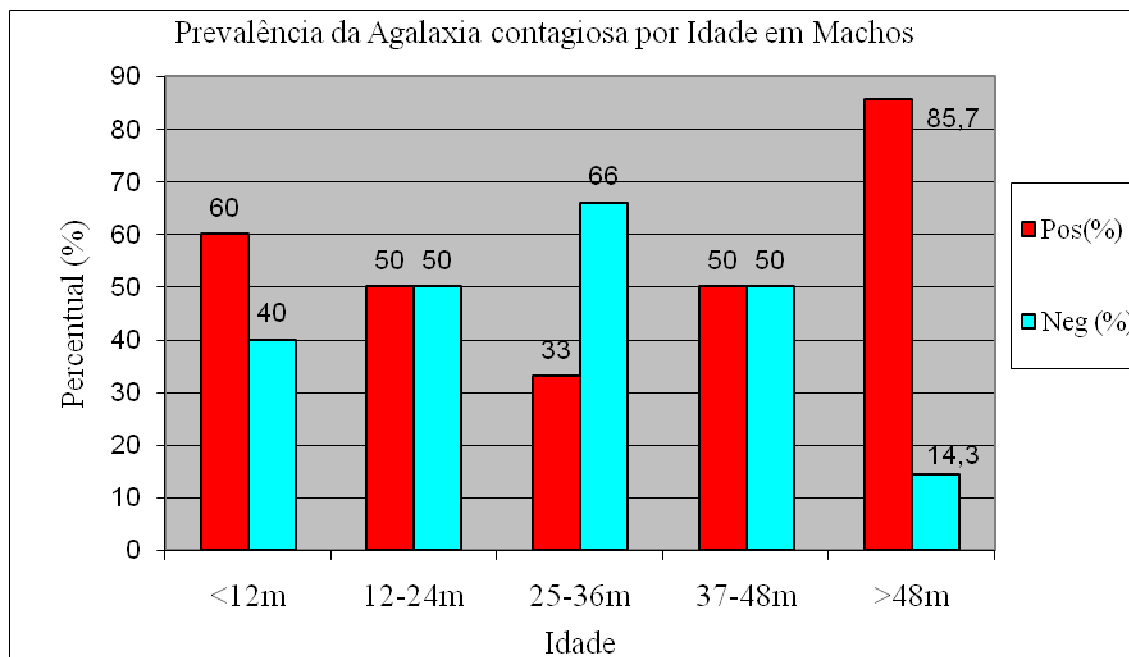


Figura 5. Prevalência da Agalaxia contagiosa em machos de acordo com a idade avaliada pelo ELISA indireto.

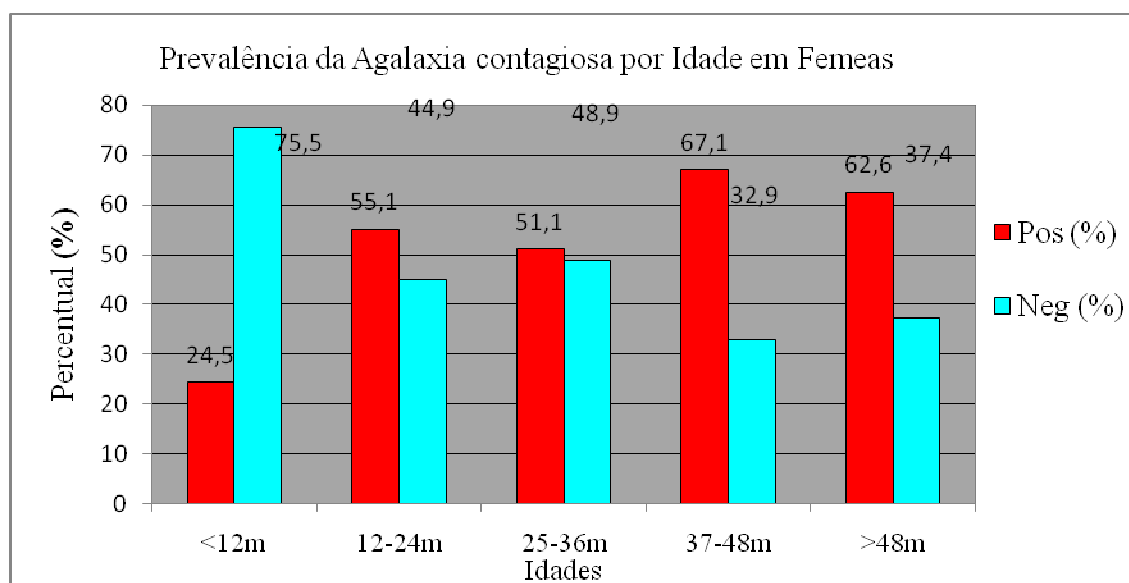


Figura 6. Prevalência da Agalaxia contagiosa em fêmeas de acordo com a idade avaliada pelo ELISA indireto.

CAPÍTULO II

RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAPRINOS VACINADOS CONTRA AGALAXIA

CONTAGIOSA

(SERÁ SUBMETIDO À REVISTA VACCINE)

O presente trabalho foi formatado segundo as normas da Revista Vaccine de acordo com o que estabelece a Norma n° 01/2007 de 09 de Abril de 2007, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos - PB.

Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa

Maria Dalva Bezerra de Alcântara², Edisio Oliveira de Azevedo³, Ana Cláudia Campos⁴,
Elmiro Rosendo do Nascimento⁴, Márcia Almeida de Melo³, José Morais Pereira Filho³,
Aderaldo Alcântara de Farias⁴, Dalana Régia Melo de Sousa²,

Universidade Federal de Campina Grande, Av Universitária, Santa Cecília, Patos-PB, Cep:
58708-110, Caixa Postal 64 - FONE: (083) 3511-3000 - FAX: (083) 3511-3009, E-mail:
eoazevedo@bol.com.br

Resumo

Duas vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa contendo adjuvante oleoso e aquoso foram avaliadas em 73 caprinos com cinco meses de idade. Os animais foram divididos em dois experimentos. No experimento I, os animais foram divididos em dois grupos de 28 e 30, respectivamente, que foram imunizados com três doses de cada vacina. Os caprinos foram mantidos para observação clínica e coleta de sangue em uma área isolada de uma propriedade com histórico de casos da enfermidade. Paralelamente, foi desenvolvido um segundo experimento, onde os animais foram divididos em três grupos de cinco animais, mantidos em área sem ocorrência da doença, sendo dois tratados e um grupo controle. Os 15 animais deste experimento foram submetidos ao desafio, através da administração de 10^6 UFC/ml de cultura de *M. agalactiae*, por via subcutânea, 30 dias após a segunda dose de cada vacina e acompanhados diariamente com aferições dos parâmetros fisiológicos e exame clínico para verificação de alterações relacionadas com a enfermidade. Os níveis de anticorpos, detectados por ELISA indireto, demonstraram que os animais imunizados com a vacina oleosa apresentaram níveis estatisticamente superiores e persistentes ($p < 0,05$) quando comparados aos da vacina aquosa e aos do grupo controle nos dois experimentos.

Palavras-chaves: Adjuvante, Anticorpos, Vacina

Abstract

This work tested two inactivated vaccines against contagious agalactia containing aqueous and oil adjuvant. The vaccines were evaluated in 73 goats with five months of age. The animals were divided into two experiments. In the first 58 animals were divided into two groups of 28 and 30 goats, that were immunized with three doses of aqueous and oil adjuvant vaccine, respectively. The goats were kept on isolated area in a farm with historical cases of the disease. Clinical signs of contagious agalactia were observed during the experiment and blood samples were taken on vaccine booster day. On the second experiment the animals were divided into three groups (control, oil adjuvant and aqueous vaccine) of five animals and kept in an area without the disease.

After vaccination all animals were submitted to challenge 30 days after the second dose with 10^6 UFC/ml of *M. agalactiae*, subcutaneously. Physiological parameters and clinical signs of contagious agalactia were observed continuously. Antibody levels measured for ELISA demonstrated that animals immunized with oil adjuvant vaccine showed antibody levels statistically higher ($p < 0.05$) when compared with aqueous vaccine and control groups in both experiments.

Keywords: Adjuvant, Antibodies, Vaccines

1. Introdução

Mycoplasma agalactiae é o principal agente etiológico da agalaxia contagiosa (AC), doença infecciosa de pequenos ruminantes, caracterizada por mastite, agalaxia, artrite e conjuntivite. A doença é endêmica em países do Mediterrâneo e causa perdas econômicas acentuadas, devido à redução na produção de leite, aumento da mortalidade em animais

jovens e redução da vida produtiva dos animais infectados. Várias estratégias de prevenção têm sido empregadas para minimizar os sinais clínicos da agalaxia contagiosa, incluindo antibioticoterapia, abate ou sacrifício e vacinação [1]. Em estudo recente, testou-se um bioterápico produzido a partir de *M. agalactiae* em caprinos clinicamente enfermos obtendo-se resultados clínicos satisfatórios e de baixo custo para o produtor [2]. Vacinas vivas atenuadas foram também utilizadas, mas estas levantaram várias preocupações relacionadas com a inocuidade e eficácia, e não são permitidas em muitos países [3].

Na Europa, vacinas inativadas são empregadas para controle da enfermidade, visto que as vacinas vivas não são permitidas [4]. Diante dessas dificuldades nenhuma vacina contra Agalaxia contagiosa caprina tem sido adotada universalmente [3]. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados para desenvolver vacinas seguras e eficazes contra *M. agalactiae* [5,6,7,8,9,10]. *M. agalactiae* inativado, é normalmente combinado com óleos minerais ou hidróxido de alumínio como adjuvantes para aumentar a efetividade das vacinas. Adjuvante oleoso induz uma resposta de anticorpos mais duradoura que o hidróxido de alumínio [11, 6], mas induzem reações locais que podem ser confundidas com abscessos ou provocar danos à musculatura. A utilização de adjuvantes possibilita a melhoria da eficiência das vacinas [12], auxiliando uma resposta imune com maior intensidade, maior duração e com uma quantidade menor de antígeno, podendo assim diminuir custos na produção destes produtos [13]. Os adjuvantes apresentam diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados baseados na via de administração e na imunidade requerida para cada tipo de vacina [14].

No Brasil, a vacinação contra agalaxia contagiosa não é realizada por pelo menos dois motivos. Indisponibilidade de vacinas no mercado; poucos relatos da doença ou prevalência no país. Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar a indução dos níveis

de anticorpos utilizando vacinas inativadas, de origem européia, adsorvidas com adjuvante aquoso e oleoso para a prevenção da agalaxia contagiosa.

2. Material e Métodos

2.1 Vacinas

As vacinas foram fornecidas pelo Istituto Zooprofilático Sperimentale Della Puglia e Della Basilicata na Itália, para uso experimental em animais de áreas com diagnóstico da doença, sendo dois tipos: uma contendo hidróxido de alumínio como adjuvante e outra contendo adjuvante oleoso.

2.2 Animais

Cabritos nascidos de cabras provenientes de áreas com diagnóstico positivo de Agalaxia contagiosa foram utilizados para o experimento. Para garantir que as matrizes não tivessem contato com as crias, o parto foi induzido com a administração de 75µg de cloprostenol, aos 145 dias de gestação. Os cabritos foram separados imediatamente da mãe e encaminhados para uma área distante quatro km do foco, em sentido oposto ao vento. Os recém-nascidos receberam colostro artificial produzido com leite de vaca pasteurizado, procedimento já adotado rotineiramente na Estação Experimental de Pendência da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária - EMEPA. Os animais foram acompanhados diariamente para observação de alterações inerentes a Agalaxia contagiosa.

2.3 Grupos experimentais:

Os animais foram subdivididos em dois experimentos para verificação dos níveis de anticorpos:

Amostras de soros foram coletadas antes da vacinação, no dia das doses de reforço e 180 dias no experimento I e 30 dias após a segunda dose no experimento II.

2.3.1 Experimento I

Os animais foram mantidos em uma área separada de uma propriedade com histórico da enfermidade, divididos da seguinte forma:

Grupo A1 (vacina aquosa): Vinte e oito animais receberam três doses da vacina aquosa, sendo as duas primeiras com 14 dias de intervalo e um reforço aos 180 dias.

Grupo B2 (vacina oleosa): Trinta animais receberam três doses da vacina oleosa, sendo as duas primeiras com 21 dias de intervalo e um reforço aos 180 dias.

2.3.2 Experimento II

Os animais foram mantidos no hospital veterinário da UFCG em área separada onde não havia histórico da enfermidade, divididos da seguinte forma:

Grupo A (vacina aquosa): cinco animais receberam duas doses de 2mL da vacina aquosa com quatorze dias de intervalo.

Grupo B (vacina oleosa): cinco animais receberam duas doses de 1mL da vacina oleosa com 21 dias de intervalo.

Grupo C (controle): cinco animais não vacinados, que receberam duas doses de 2ml de solução salina fisiológica a 0,9%..

Todos animais vacinados (vacina aquosa, oleosa e salina) foram desafiados 30 dias após a segunda dose da vacina.

2.3.3 Desafio

Os animais do experimento II foram desafiados com 10^6 UFC/ml de cultura de *M. agalactiae*, administrado por via subcutânea 30 dias após a segunda dose das vacinas.

2.4 Exame clínico

Diariamente, todos os animais foram examinados para observações de sinais clínicos sugestivo de Agalaxia contagiosa e verificação dos parâmetros fisiológicos (Temperatura retal, Frequência cardíaca, Frequência respiratória).

2.5 Sorologia

Os níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* foram determinados pelo método ELISA indireto, conforme descrito por [15]. As placas foram sensibilizadas com o antígeno e incubadas em câmara úmida “overnight” a 37°C. Três lavagens com PBS contendo 0,1% Tween 20 (v/v) (PBS-T) foram realizadas e as placas bloqueadas pela adição de 2% de BSA em PBS por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após, três lavagens com PBS-T, 100µL das amostras de soros diluídas em PBS contendo 2% de leite em pó desnatado e 10mM de EDTA (p/v) foram distribuídas em cada poço, e as placas incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Fez-se nova lavagem com PBS-T, 100µL do conjugado de proteína G-peroxidase diluído 1:90.000 e distribuídos nos poços, as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, 100µL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,1mg/ml de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio (v/v) foram adicionados. Após 15 minutos, a reação foi bloqueada com 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N e a leitura da densidade óptica (DO) realizada com filtro de 450nm

2.6 Estatística

A análise estatística foi determinada utilizando os procedimentos do PROG. GLM (General-Linear-Models) do SAS 2002[16], com efeitos interativos avaliados entre tratamentos e coletas, comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade..

3. Resultados

Os níveis de anticorpos contra *M. agalactiae* nos diferentes grupos dos experimentos I e II estão demonstrados nas figuras 1 e 2.

Neste estudo, observa-se que antes da vacinação os níveis de anticorpos apresentados em todos os grupos foram insignificantes. Na segunda e terceira doses os níveis de anticorpos foram crescentes em todos os grupos, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo imunizado com a vacina aquosa (Exp.II). Já a vacina oleosa induziu níveis de anticorpos significativamente mais elevados, demonstrando ser mais eficaz que a vacina aquosa.

Observa-se que no grupo imunizado com a vacina aquosa não houve diferença estatisticamente significativa na primeira, segunda e terceira doses. Em contrapartida, no tratamento com vacina oleosa, os níveis de anticorpos na primeira e segunda doses foram semelhantes, mas diferentes dos obtidos na terceira dose (180 dias). (Exp. I)

No dia da primeira dose não houve diferença estatística dos níveis de anticorpos entre o adjuvante aquoso e oleoso, porém, na segunda e terceira doses, observam-se diferença significativa para ambos os tratamentos.

Verifica-se que alguns animais já apresentavam algum nível de anticorpos, e após a vacinação, houve um aumento considerável e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no grupo imunizado com vacina oleosa. No entanto, o grupo da vacina aquosa, apesar dos níveis de anticorpos terem sido crescentes, não foi significativo.

M. D. B. Alcantara et al. / Vaccine

Figura 1. Média dos níveis de anticorpos contra *M. agalactiae* em caprinos (experimento I) imunizados com vacina aquosa e oleosa determinado pelo ELISA indireto.

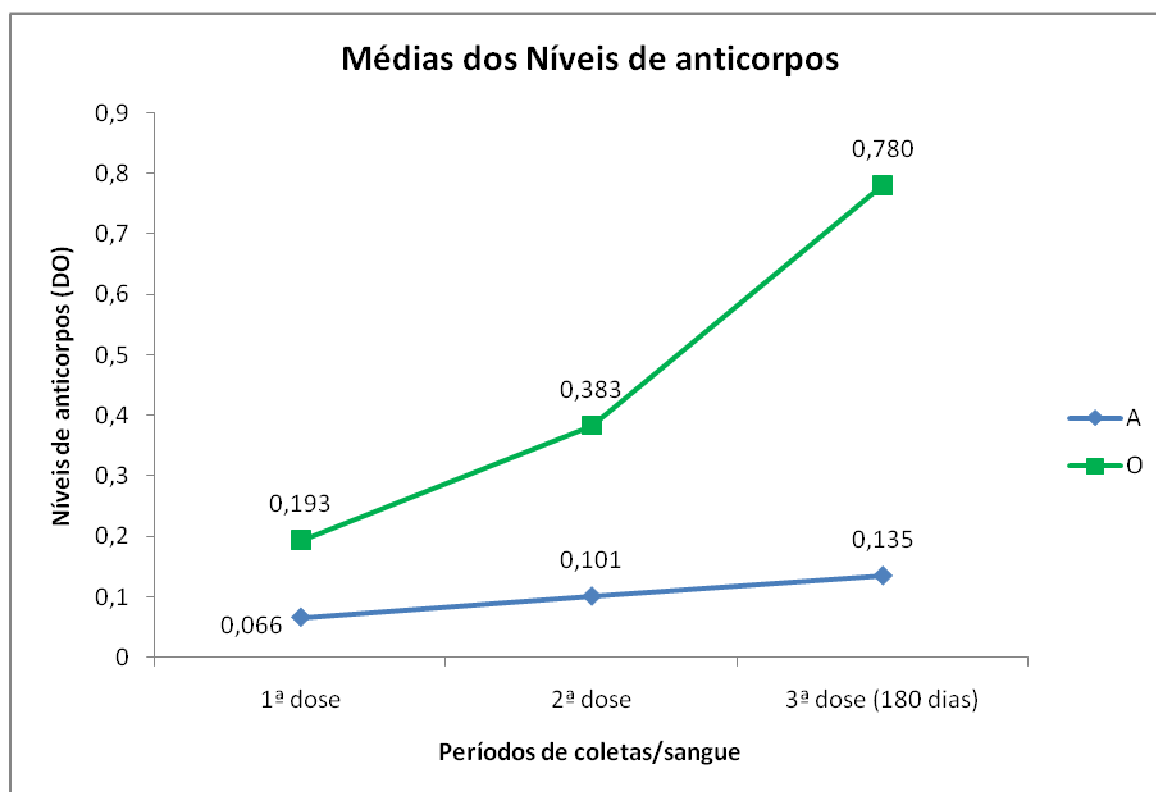
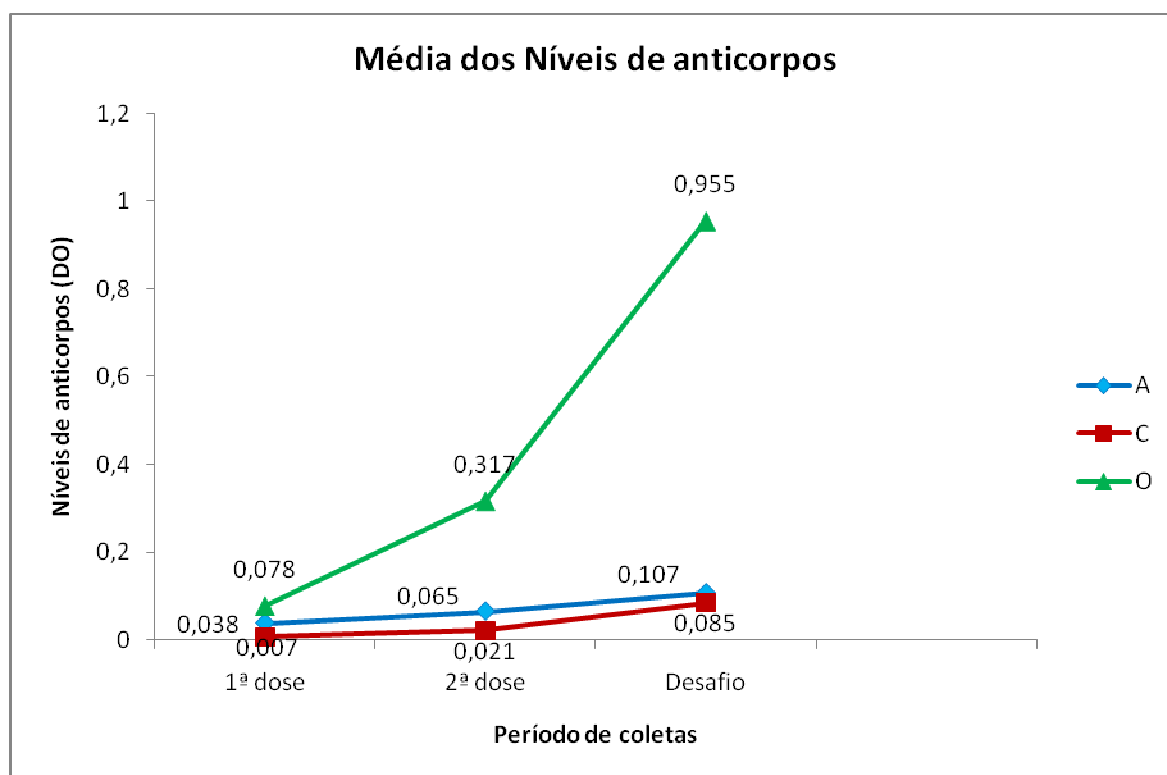


Figura 2. Média dos níveis de anticorpos em caprinos (experimento II) imunizados com vacinas aquosa e oleosa contra *Mycoplasma agalactiae* determinado pelo método ELISA indireto.



No experimento I não foram observados sinais característicos da doença e os animais do experimento II submetidos ao desafio também não apresentaram sinais clínicos da agalaxia contagiosa e os padrões fisiológicos (temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória) mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie (dados não mostrados), assim como os animais do grupo controle que permaneceram no mesmo ambiente e em contato com os animais dos grupos vacinados.

4 Discussão

A ausência de sinais clínicos nos animais do grupo controle do experimento II reflete a dificuldade de reprodução experimental com *Mycoplasma* spp. Isto provavelmente está relacionado com a via de administração do inóculo, dose infectante ou mesmo a patogenicidade da amostra utilizada. Caprinos infectados com 10^9 UFC/ml de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) por via intra-bronqueal apresentaram ligeira elevação de temperatura na primeira semana e apenas um animal apresentou tosse severa entre 5 e 19 dias pós infecção [17]. Os autores relatam ainda que não foram observados lesões pulmonares nem foi possível o isolamento de *M. mycoides capripneumoniae* dos pulmões dos animais infectados.

A reprodução clínica a partir de infecções experimentais com diferentes microrganismos nem sempre apresentam resultados satisfatórios. Estudos realizados para investigar vias de administração com outros agentes [18] observaram que a via subcutânea, intraperitoneal e escarificação cutânea foram eficazes para instalação de infecções em relação as vias oral e conjuntival.

Quanto aos níveis de anticorpos [6] ao compararem níveis e persistência de anticorpos contra *M. agalactiae* induzidos por vacina com adjuvante oleoso e aquoso, comprovaram que o adjuvante oleoso induziu níveis mais elevados e que persistiram por mais tempo que o hidróxido de alumínio.

Em trabalho realizados com caprinos imunizados contra agalaxia contagiosa observou-se que frequência de sinais clínicos apresentados foram em menor intensidade que os do grupo controle [9].

Resultados semelhantes foram encontrados quando avaliaram a eficácia de uma vacina inativada com emulsão de óleo contra *M. agalactiae* em ovinos infectados experimentalmente [8]. Os autores observaram que as ovelhas desenvolveram níveis elevados de anticorpos e, após desafio, não apresentaram quaisquer sinais clínicos da doença.

Vacinas inativadas preparadas com Montanide ISA-563, Marcol-52 e Montane-80, na proporção de 30%, 63% e 7%, respectivamente, foram capazes de induzir proteção clínica aos animais desafiados com *M. agalactiae* [10].

Em estudo realizado com cordeiros e cabritos utilizando vacinas combinadas de *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, por um período de 120 dias, observou que os cabritos apresentaram níveis de anticorpos mais elevados que os cordeiros para ambos antígenos, registrando diferença significativa para o antígeno de *M. agalactiae* [19].

Estudo em caprinos, usando montanide ISA 206 em vacinas contra febre aftosa, mostrou que esse componente estimula resposta mais rápida e elevada do que as vacinas formuladas com hidróxido de alumínio [20].

Vacinas com adjuvante oleoso usualmente provoca uma reação tissular no ponto de inoculação, podendo variar com o local, a espécie animal, a formulação, tipo, composição e qualidade do adjuvante oleoso.

A espécie caprina tem tendência a dar uma maior reação tissular local que a ovina (Raul A. Casas, 2009- comunicação verbal). No presente trabalho não foi observada nenhuma reação local ou sistêmica nos animais vacinados no decorrer dos experimentos.

4. Conclusão

A vacina contra *M. agalactiae* produzida com adjuvante oleoso induziu níveis de anticorpos mais elevados e mais duradouros que a vacina produzida com adjuvante aquoso.

Não foi possível a reprodução experimental da infecção por *M. agalactiae* por via subcutânea em caprinos.

Agradecimentos

Ao Instituto Zooprofilático Sperimentale Della Puglia e Della Basilicata (Itália), pela gentileza do fornecimento das vacinas para a realização deste trabalho.

5. Referência

[1]- **Bergonier, D., Berthelot, X. Poumarat, F. 1997.** Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnostic and control. Rev. Sci. Tech Off Epiz.; 16: 848-73.

[2]- **Marinho, M.L. 2008.** Ação terapêutica do bioterapico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos (*Capra hircus*, linnaeus, 1758) com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, p123 (Tese de Doutorado).

- [3] - **OIE, 2000.** Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines: contagious agalactia, Section 2.4, Chapter 2.4.3. Web. Page <http://www.oie.int/>. Acesso em Janeiro 2010.
- [4] - **OIE, 2008.** Disponível em: <http://www.oie.int./wahid-prod>. Acesso em 08/05/2010.
- [5] - **Leon Vizcaino, L., Garrido Abellán, F., Cubero Pablo, M.J, Perales, A. 1995.** Immunoprophylaxis of caprine contagious agalaxia due to *Mycoplasma agalactiae* with na inactivated vaccine. Vet. Rec.; 137: 266-9. In.: In.: Christian de La Fe et al., Field Trial two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subesp. *Mycoides* (large colony type) in goats,. Vaccine 25: 2340-2345.
- [6] - **Buonavoglia, D.; Fasanella, A. Sagazio, P. Tempesta, M. Iovane, G. Buonavoglia, C. 1998.** Persistent of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. The microbiologica ISSN 1121-7138, v.21, n.º 2, p. 209-212.
- [7] - **Tola, S., Manunta, D., Rocca, S., Mocchigliani, A.M., Indini, G., Angioi, P.P., Leori, G. 1999.** Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. Vaccine, 17: 2764-2768.
- [8] - **Greco, G., Corrente, M., Buonavoglia, D., Aliberti, A., Fasanella, A. 2002.** Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. The microbiologica ISSN 1121-7138, v.25, n.º 1, p. 17-20.
- [9] - **De La Fe, C., Assunção, P., Saavedra, P., Tola, S., Poveda, C., Poveda, J.B. 2007.** Field Trial two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subesp. *Mycoides* (large colony type) in goats, Vaccine 25: 2340-2345.
- [10]- **Buonavoglia, D., Greco, G. Quaranta, V. Corrente, M. Martella, V. Decaro, N. 2008.** An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. New Microbiologica 31. 117-123.

- [11] - **Garba, S.A., Terry, R.J., Lamorde, A.G., Abalaka, J.A. 1989.** The choice of adjuvants in vaccines. *Microbios*;57: 15-9. In.: Christian de La Fe et al., Field Trial two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* (large colony type) in goats,. *Vaccine* 25: 2340-2345.
- [12] - **Klein, J., Horejs I, V. Immunology. 2 ed. London: Blackwell Science, 1997.** 722p. Cap. 13: Antigenes: p.393-421. Cap. 21: Defense against invaders: p. 532-595. In.: Alexandre Trindade Leal et al, 2002. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium Insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. *Cienc. Rural*, v.32, n.6. Santa Maria. Dec. 2002.
- [13] – **Resende, F.C.B. 2004.** Adjuvantes de vacinas. *Rev. bras. de alergologia e imunopatologia*. Vol. 27, n. 3.
- [14] – **Mota, E.F., Lima, M.G.S., Melo, D.F. 2006.** Adjuvantes Imunológicos: Avanços e Perspectivas. *Ciência Animal* 16(2): 79-88.
- [15] Campos A.C., Teles J.A.A., Azevedo E.O., Nascimento E.R., Oliveira M.M.M., Nascimento S.A., Castro R.S. 2009. ELISA protein G for the diagnostic of contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminants Research* 84 70-75.
- [16] - **PROG. GLM (General-Linear-Models) do SAS 2002** (Statistical Analysis System. **SAS user's guide**): statistics. Versão 5. Cary: SAS.
- [17] – **March, J.B. Harrison, J.C. Borich, S.M. 2002.** Humoral immune response following experimental infection of goats with *Mycoplasma capricolum* subsp. *Caprineumoniae*. *Veterinary Microbiology* 84: 29-45.
- [18] – **Macedo, N.A. Morais, Z.M. Camargo, C.R.A. Alves, C.J. Júnior, R.N. Vasconcellos S.A. 2004.** Influencia da via de inoculação sobre o estabelecimento e a

evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona.

[19] – **De La Fe, C. Rodriguez, R. Assunção, P. Ramirez, A. Flores, P. Poveda, J.B. 2006.** Humoral immune response in lambs and goats kids inoculated with dual vaccine against contagious agalactia. *An Vet (Múrcia)* 22: 87-91.

[20] - **Gupta, R. K., Siber, G. R. 1995.** Adjuvant for human vaccines: current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v.13, n.14, p. 1263-1276.

[21] – **Casas, R.A. 2009.** Reacciones en la administración de vacunas antiaftosa de adjuvante oleoso. In: Luis E. Dias, S. Sallua, E. Perdomo, C. Paullier, M. Baraibar, R. Pérez Rama., Observacion de La respuesta de los tejidos em ovinos vacunados com vacuna antiaftosa de adjuvante oleoso. *Boletin Del Centro panamericano de Fiebre Aftosa*, nº 41-42, enero-junio, 1981, PP. 27-33.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença da infecção por *Mycoplasma agalactiae* em mais de 50% dos rebanhos de caprinos leiteiros estudados no Cariri Ocidental implica na necessidade de um estudo mais aprofundado sobre outros possíveis agentes envolvidos, bem como uma maior atuação dos órgãos de pesquisa e vigilância sanitária para controle e/ou erradicação desta enfermidade nos rebanhos regionais.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, o desenvolvimento de vacinas, utilizando amostras locais deve ser estimulado para prevenção e/ou erradicação da agalaxia contagiosa e com acessibilidade aos produtores.

Uma vez que, o método Elisa indireto utilizado, demonstrou ser uma ferramenta rápida e segura para identificar animais infectados, este deve ser usado para controlar o trânsito de animais entre os rebanhos.

ANEXOS



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através dos e-mails <jurgen@ufrj.br> ou pvb@pvb.com.br, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF anexo). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIALE MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

- a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
- b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científicas, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:
Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;
- c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;
- d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões.

Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

- e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;
- h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos.

Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.**

Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Embrapa-CNPAB/PSA
Km 47 - Seropédica
23851-970 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel.: +55 21 2682-2940
Tel./Fax: +55 21 2682-1081

NORMAS VACCINE

Guide for Authors

Please follow these instructions carefully to ensure that the review and publication of your paper is as swift and efficient as possible. These notes may be copied freely.

Submission of manuscripts

Online submission of papers

The preferred mechanism of submission of manuscripts is electronic, by using the electronic submission tool at <http://ees.elsevier.com/jvac>. After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply which incorporates the manuscript number for future correspondence. Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address.

For those authors who cannot submit via EES, please refer to the appropriate Regional Editor to send a hardcopy to in accordance with the instructions below. It would be advised to email the Editor first as he/she may be able to assist with the (technical) submission problem.

Authors must include a cover letter that contains the title, authors, a brief outline of the work's originality, desired section of publication, corresponding author's name, address, telephone and fax numbers (including country and city codes), and e-mail address.

Vaccine also publishes Review articles (which are usually invited by Reviews Editor), Letters and Reports, Book Reviews and Conference Reports. With the exception of Review articles, all other submissions should be sent to the Editor or one of the Regional Editors. Contributions are normally received on the understanding that they comprise original, unpublished material and are not being submitted for publication elsewhere. Translated material, which has not been published in English, will also be considered. All submissions should be accompanied by a written declaration, signed by all authors, that the paper has not been submitted for consideration elsewhere. Authors are solely responsible for the factual accuracy of their papers. The receipt of manuscript will be acknowledged.

Any queries regarding accepted papers, proofs or offprints should be addressed to the Production Office, Vaccine, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter EX1 2AH, UK. Telephone: +44 (1392) 251558. Fax: +44 (1392) 425370.

Review process

All contributions are read by two or more referees to ensure both accuracy and relevance, and revisions to the script may thus be required. On acceptance, contributions are subject to editorial amendment to suit house style. When a manuscript is returned for revision prior to

final acceptance, the revised version must be submitted as soon as possible after the author's receipt of the referee's reports. Revised manuscripts returned after four months will be considered as new submissions subject to full re-review.

Suggestions for potential reviewers

Authors are invited to provide the names, addresses, phone numbers and e-mail addresses of up to six potential reviewers. It would not be appropriate to nominate individuals that have had any input into the manuscripts submitted or any recent collaboration with the authors. The Editors may or may not take these suggestions into account during the reviewing process.

Copyright

The submission of a paper will imply that, if accepted for publication, it will not be published elsewhere in the same form, in any language, without the consent of the Publisher. Before publication, authors are requested to assign copyright to Elsevier Ltd to sanction reprints and photocopies, and to authorize the reprinting of complete issues or volumes according to demand. It is the author's responsibility to obtain written permission to quote material that has appeared in another publication.

Preparation of scripts

You should write in clear and concise English. Spelling should follow the Oxford English Dictionary. Authors whose native tongue is not English are assured that in-house editorial attention to their contributions will improve clarity and acceptability to readers. Please double space all text and number every sheet of paper. Authors are responsible for ensuring that all manuscripts (whether original or revised) are accurately typed before final submission. Manuscripts will be returned to the authors with a set of instructions if they are not presented according to these Notes for Authors.

Arrangements of papers

You should arrange your contribution in the following order:

1. Paper title, author's name, affiliation, full postal address, telephone and fax numbers and e-mail address. Affiliation and addresses of co-authors should be clearly indicated. The title should be short, specific and informative.
2. A self-contained abstract of approximately 100 words (on a separate sheet of paper), outlining in a single paragraph the aims, scope and conclusions of the paper; three keywords, for indexing purposes; abbreviated article title, for use as a running headline.
3. The text, suitably divided under headings.
4. Acknowledgements (if any).
5. References (double spaced, and following the journal style).
6. Appendix (if any).
7. Tables (each on a separate sheet).
8. Captions to illustrations (grouped on a separate sheet or sheets).
9. Illustrations, each on a separate sheet containing no text and clearly labelled with the journal title, author's name and illustration number.

Style of text

Subdivide your paper in the simplest way possible, consistent with clarity. The text should usually follow the standard sequence of Introduction, Materials and Method, Results and Discussion. Headings and subheadings for different sections of the paper should be clearly

indicated and numbered 1., 2., 2.1, etc. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in number order. Note that trade names should have an initial capital letter.

Units and abbreviations

All measurements and data should be given in SI units, or if SI units do not exist, in an internationally accepted unit. If you use any symbol or unit that may not be generally recognized, please include an explanatory footnote the first time it is used, to help the referees, editors and readers. It is also helpful to identify Greek symbols by name in the margin the first time they appear. Abbreviations and acronyms should only be used for unwieldy terms and names which occur frequently in the manuscript. Abbreviations should be used consistently throughout the text, and must be clearly defined in full on first use.

Mathematical and technical setting

Detailed mathematical discussion should be placed in an appendix. Equations and formulae should be typewritten wherever possible. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Special symbols should be identified in the margin, and the meaning of all symbols should be explained in the text where they first occur. If you use several symbols, a list of definitions (not necessarily for publication) will help the editor. Type or mark mathematical equations exactly as they should appear in print. Journal style for letter symbols is as follows: variables, italic type (indicated by underlining); constants; roman type; matrices and vectors, **bold type** (indicated by wavy underlining).

Preparation of supplementary data. Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Tables

Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals, and given a suitable caption. All table columns should have an explanatory heading, and, where appropriate, units of measurements. Footnotes to tables should be typed below the table, and should be referred to by superscript letters. Avoid the use of vertical rules. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, e.g. in graphs.

Illustrations

All graphs, photographs, diagrams and other drawings (including chemical structures)

should be referred to as Figures, and numbered consecutively in Arabic numerals. All illustrations must be clearly labelled with the journal title, author's name and figure number. **Illustrations should be provided in camera ready form, suitable for reproduction without retouching, and should be either 85 mm (one column width) or 176 mm wide (two column width).** Wherever possible figures should fit one column and so may be photographically reduced, so please ensure that lines and labeling are sufficiently large to allow for any reduction in size. Please ensure that all artwork complies with these requirements. Please ensure that all illustrations within a paper are consistent in style and quality.

A table is usually more effective than a graph or a paragraph of text for recording data.

Graphs and line drawings

The minimum amount of descriptive text should be used on graphs and drawings; label curves, etc., with single-letter symbols (i.e. a, b, c, etc.) and place descriptive matter in the figure caption. Scale grids should not be used in graphs unless required for actual measurements. Please use a selection of the following symbols on graphs: +, x, (open square), (closed square), (open circle), (closed circle), (closed triangle), (upside down closed triangle). Graph axes should be labelled with the variable written out in full, along the length of the axis, with the unit in parentheses (for example, Length of sample (mm)). Lower case letters should be used throughout, with an initial capital letter for the first word only.

If your illustrations are computer generated, please supply the blackest possible laser output.

Photographs

Supply four sets of black and white prints. If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable. Colour reproduction is available if the author is willing to bear the additional reproduction and printing costs. Please contact the editorial office for details. A letter confirming the author's willingness to accept these costs should be sent with the revised manuscript. Authors should note that illustrations will not be returned unless specifically requested.

Colour illustrations with Colourful e-Product

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Please make sure the artwork is in an acceptable format (TIFF, EPS, MS Office files) and is at the correct resolution. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.]

References

In the text, references should be numbered consecutively within square brackets (e.g. [1]). If you cite a reference more than once in the text, use the same number each time. References in the reference list should accord with the system in *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (N Engl J Med 1991;34:424-428). Please ensure that references are complete.

Examples (journal [1], book [2] and book chapter [3]):

[1] Marsano LS, West DJ, Chan I, Hesley TM, Cox J, Hackworth V, Greenberg RN. A two-dose hepatitis B vaccine regimen: proof of priming and memory responses in young adults. *Vaccine* 1998;16(6):624-29.

[2] Sherlock S. *Diseases of the Liver and Biliary System*. London: Blackwell Scientific Publications, 1981.

[3] Katz JM, Lu X, Galphin JC, Clements, JD. Heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* as an adjuvant for oral influenza vaccination. In: Brown LE, Hampson AW Webster RG, editors. *Options for the Control of Influenza III*. New York, Elsevier, 1996: 292-97.

Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more list only the first six and add et al. Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts in preparation or submitted for publication.

Proofs

Correspondence and proofs for correction will be sent to the first named author unless otherwise indicated.

Proofs should be checked carefully. *Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage*. Corrected proofs should be returned to the Publisher by airmail, and preferably also by fax, within two days of receipt.

Offprints and reprints

The corresponding author at no extra cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a coversheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Extra copies of offprints, minimum 50, can be ordered on the form sent out to you.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/vaccine>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Page Charges

There are no page charges.

MODELO DO QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO APLICADO NAS PROPRIEDADES**Proprietário:****Grau de escolaridade:****IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE****Área:** _____ha**Tipo de Aprisco :** Chão Batido Ripado Cimentado Outro _____**Pastagem :** Natural Artificial Ambas**Área de Pastagem :**

Natural : _____ ha Artificial : _____ há

Tipo de Pastagem Artificial _____**Finalidade da Pastagem Artificial :** Feno Silagem Pastoreio Direto
 Suplementação à Cocho**Possui Reserva de Mata Nativa :** Não Sim**Área da Reserva:** _____ há**Possui Cercas Limítrofes ?** Não Sim**Possui cercas de divisão de cercados ?** Não Sim**Alimentação :** Pasto Silagem Feno Palma Capim de Corte Concentrado Industrial Outro
_____**Mineralização :** Não Sim Qual : _____**Sala de Processamento de Leite :** Não Sim Tipo : _____**Destino do Leite :** Consumo Venda**A Comercialização é Feita :** In Natura Congelado Subprodutos**Local de Comercialização :** Mesmo Município Em Outro Município _____**Fabricação de Subprodutos :** Queijo Iorgute Doce de leite Sorvete
 Outro _____**Acompanhamento Técnico :** Não Sim **Profissional que realiza o acompanhamento :** Veterinário Zootecnista Engenheiro Agrônomo Técnico em Agropecuária
 ADR**Frequência de Acompanhamento Técnico :** Semanal Quinzenal Mensal Semestral
 Só Quando Necessita**Tipo de Acompanhamento :** Privado Público

MANEJO SANITÁRIO

Numerar, em ordem de importância, as alterações clínicas, colocando o mesmo número nas de mesmas importâncias.

- () Aborto () Ectoparasitoses
 () Artrite () Linfadenite Caseosa - Mal do Caroço
 () Mííases - Bicheiras () Mamites
 () Ceratoconjuntivites () Pneumonias
 () Diarréias Frequentes () Pododermatites - Mal dos Cascos
 () Sintomas Nervosos () Ectima Contagioso

Vermifugação:

- () Não () Sim Freqüência : _____

Produto(s) utilizado(s) _____

Alterna o produto utilizado na vermifugação?

- () Não () Sim Periodicidade : _____

Práticas zoonitárias adotadas com freqüência:

- () Administração do colostro
 () Corte e desinfecção do umbigo
 () Marcação
 () Vermifugação
 () Permanência mínima de 12 horas após a vermifugação no curral
 () Desinfecção do curral após vacinação e vermifugação
 () Troca anual do vermífugo
 () Faz uso de esterqueiras
 () Vermífuga os animais recém chegados na Propriedade
 () Faz quarentenário mesmo dos animais da Propriedade após feiras
 () Separa animais jovens de adultos
 () Separa machos de fêmeas
 () Faz descanso de pastagens
 () Enterra ou crema animais mortos com morte natural
 () Os diagnósticos são feitos por técnicos
 () Isola animais doentes
 () Possui piquete maternidade
 () Esteriliza material de aplicação de medicamentos
 () Usa seringas e agulhas descartáveis
 () Faz aleitamento artificial
 () Adota e cumpre calendário profilático

| Vacinas | |
|---------|------------|
| Doença | Freqüência |
| | |
| | |

| Exames Laboratoriais | | | | |
|----------------------|-----|-----|------------|---------------|
| Doença | Não | Sim | Observação | Periodicidade |
| Coprológico | | | | |
| Brucelose | | | | |
| Leptospirose | | | | |
| Tuberculose | | | | |
| Toxoplasmose | | | | |
| CAEV | | | | |

CONTROLE DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

Tem conhecimento da doença ? () Não () Sim

Tem diagnóstico no rebanho ? () Não () Sim

Tipo de diagnóstico : () Clínico () Laboratorial

Assinale com um "X", no quadro a seguir, as medidas adotadas no criatório e acrescentar outras não citadas.

| X | Medidas |
|---|---|
| | Sorologia periódica e sacrifício dos positivos |
| | Sorologia periódica e separação dos positivos |
| | Sorologia de todos os animais antes e 30 dias após a compra |
| | Utilização individual de materiais descartáveis (seringas e agulhas) ou esterilizados |
| | Desinfecção do número do tatuador antes do uso em cada animal |
| | Separação imediata das crias e das mães logo após o parto |
| | Administração de colostro de cabra termizado e leite pasteurizado ou fervido |
| | Administração de colostro e leite de vaca como substituto aos de cabra |
| | Utilização de inseminação artificial com sêmen congelado procedente de lote testado por PCR |

REPRODUÇÃO**Faz estação de monta ?** () Não () Sim**Usa rufiões ?** () Não () Sim**Origem do reprodutor** () Mesmo Estado () Outro Estado _____**Usa reprodutor do vizinho** (emprestado ou permuta) () Sim () Não**Qual a Relação de Reprodutores por Matriz ?** ____ Reprodutor : ____ Matrizes

Observa Repetição de Cios ? () Não () Sim

Faz Inseminação Artificial ? () Não () Sim

Faz Diagnóstico de Prenhez ? () Não () Sim

Faz Pré-Parto ? () Não () Sim

Tem observado casos de retenção de placenta? () Não () Sim

MANEJO DAS CRIAS**Identificação do Rebanho :** () Não () Sim**Tipo de Marcação :** () Brinco () Tatuagem

() Medalha () Corte na Orelha

() Outro _____

Tipo de colostro dado às crias :

() Vaca () Cabra () Artificial

Tratamento do Colostro :

() In Natura () Pasteurizado () Termizado

Possui Banco de Colostro ? () Não () Sim**Aleitamento :** () Natural () Artificial**Leite Utilizado no Aleitamento :**

() De Cabra () de Vaca () de Soja () Artificial () Outro

PRODUÇÃO DE LEITE**Tipo de Ordenha :** () Manual () Mecânica**Número de ordenhas por dia :** () 1 () 2

() Mais de 2

Local da Ordenha : () Sala () Baia () Curral**Higienização da Sala e/ou Equipamento :**

() Não () Sim Produto _____ : _

Faz Linha de Ordenha ? () Não () Sim

Limpeza das Mãos e Úbere :

() Não () Sim Produto : _____

Imersão das Tetas Após Ordenha :

() Não () Sim Produto : _____

Tratamento Preventivo de Mamites em Cabras Secas :

() Não () Sim Produto _____

Critério de Secagem da Cabra :

() Baixa Produção () Período de Lactação

() Período de Gestação () Outro

Período Médio de Lactação : _____ dias

PRODUÇÃO DE CARNE E PELES**Local que Vende Cabritos :**

() Próprio Município () Outros Município () Outro Estado

Vende Animais :

() Em Pé () Abatidos

Idade ao Abate :

() Menos de 6 Meses () Entre 6 e 12 () Mais de 12

Compra Animais Para :

() Recria () Terminação

Beneficia a Pele ?

() Não () Sim

Destino da Pele :

() Próprio Município () Outros Município () Outro Estado

PREVENÇÃO DE VETORES E RESERVATÓRIOS DE DOENÇAS

Faz Controle de Roedores na Propriedade ? () Não () S

Como _____

Quantos Gatos Existem na Propriedade ? _____ Gatos

Os Gatos têm acesso às baias, sala de ordenha, ou currais?

() Não () Sim

Os Caprinos e Ovinos São Criados Juntos ? () Não

() Sim

Os Caprinos e Ovinos têm Contato Direto com Animais Silvestres ?

() Não () Sim

Especifique : _____