

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico da agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos.

José Andreey Almeida Teles

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico da agalaxia
contagiosa em ovinos e caprinos.**

José Andreey Almeida Teles

Graduando

Orientador: Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Patos - PB
Março de 2008



FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

T269d
2008

Teles, José Andreey Almeida.

Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico da agalaxia contagiosa de ovinos e caprinos. / José Andreey Almeida Teles. – Patos: CSTR/UFCG, 2008.

27 p.

Inclui bibliografia.

Orientador: Edisio Oliveira de Azevedo.

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Agalaxia – Ovino e caprino – Monografia. 2 – Micoplasmose.

I – Título.

CDU: 579.887:636.3

UFCG - Biblioteca Setorial

12/11/2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

José Andreey Almeida Teles

Graduando

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária como requisito obrigatório para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM: 14,03,2008

BANCA EXAMINADORA:

Edisio O. de Azevedo

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Orientador

10,0 (dez)

M. Belo

Prof.^a Dr.^a Márcia Almeida de Melo

Examinador I

10,00 (dez)

S. Santos

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo

Examinador II

10,0 (dez)

AGRADECIMENTOS

Independente da forma com que, as pessoas que cruzaram o meu caminho durante a vida acadêmica, agiram diante de mim ou de meus atos, sei que devo agradecimentos a várias delas, digo várias porque mesmo citando os nomes acabarei por cair no erro de, acidentalmente, deixar de falar em alguém.

Inicialmente quero agradecer ao ser Supremo por sempre iluminar os meus caminhos e assim, me dar forças para continuar a luta mesmo em dias difíceis.

Aos meus pais e familiares que constantemente me auxiliam com muito esforço, na busca de proporcionar as melhores condições de estudo possíveis. Pela compreensão da distância ser empecilho nas viagens para casa. Pelo apoio no desenvolvimento de vários projetos e viagens realizadas.

Ao Professor Edisio Oliveira de Azevedo por me orientar tanto pessoal como profissionalmente ao longo da caminhada acadêmica, me dando oportunidades de aprender cada vez mais. Seus atos e comportamento mostram de forma sábia sua simplicidade e inteligência, tanto na área da Pesquisa Científica como no campo da Extensão Rural. Gratifica-me bastante tê-lo como amigo.

Aos amigos Getúlio Camboim, Eduart Brito, Fábio Santos, Felipe Sobral, Carlos Magno, Héric Cavalcanti, Ítalo Reneu, Evanildo de França e Demerval Junior pelos momentos de diversão e apoio.

Ao amigo Eric Brambilla pelo apoio em sua residência em todas as vezes que foi a Recife-PE, abrindo mão de sua privacidade e acolhendo-me como irmão.

Ao amigo David Barbosa da UFRPE pelo companheirismo e compreensão dos momentos difíceis compartilhados com ele.

À minha noiva Savanna Simões Siqueira, pela compreensão e apoio constantes durante as minhas atividades acadêmicas e de pesquisa, principalmente quando eu precisava viajar.

Ao colega Médico Veterinário José Sóstenes Leite de Andrade pelo desenvolvimento de trabalhos a campo e no laboratório, o que contribuiu na minha formação profissional.

A colega Médica Veterinária Ana Cláudia Campos da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pelos trabalhos desenvolvidos a campo e nos laboratórios de viroses da UFRPE e de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA. As conversas de laboratório sempre servirão como força para continuar nas pesquisas e avançar nos estudos.

A professora Márcia Almeida de Melo que apesar de tê-la conhecido no final da carreira acadêmica, foi de grande valia o seu apoio e o bate-papo de algumas horas. Espero poder desenvolver mais atividades e ter o seu apoio e parceria.

A professora Melânia Loureiro Marinho pelo apoio nos momentos difíceis e pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelas conversas e histórias nas viagens. Sua amizade para mim é super importante.

A professora Maria das Graças Xavier de Carvalho pelos telefonemas cedidos, pelo apoio material do Laboratório de Análises de Leite e Derivados. Suas gentilezas jamais serão esquecidas.

Ao professor Francisco de Assis da Costa Silva pelos momentos de articulação e formação político-estudantil, bem como pelo acesso livre ao diálogo.

A professora Verônica Medeiros da Trindade Nobre pela orientação político-estudantil, pela concessão do livre acesso à sua pessoa a qualquer momento, pela flexibilidade e sabedoria externada e repassada. São momentos que, felizmente, não permitem deleção.

Aos professores Sara Vilar Dantas Simões e Eldiné Gomes de Miranda Neto pela compreensão e cessão de material da clínica de grandes animais do Hospital Veterinário da UFCG/CSTR para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR Fernando César Vieira Zanella, Pedro Isidro da Nóbrega Neto, Carlos Enrique Peña Alfaro, Sônia Correia Assis da Nóbrega, Gildenor Xavier Medeiros, Sérgio Santos de Azevedo, Albério Antônio de

Barros Gomes, Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá pelos diálogos estabelecidos, conversas formais e informais, pela distração, pelo compromisso, pela ajuda nas decisões, enfim pelo apoio direto e indireto nas atividades desenvolvidas ao longo da minha formação neste curso.

A técnica do Laboratório de Vacinas e Diagnóstico - LAVADI da UFCG / CSTR Gizélia Dantas pela contribuição diária com a arrumação e organização do espaço.

A secretária Teresa de Jesus Dias de Lima Nóbrega pela paciência no dia-a-dia, compreensão e atendimento às minhas necessidades apresentadas junto à coordenação de Medicina Veterinária. Não posso esquecer do cafezinho diário.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos que contribuíram significativamente para a realização das minhas atividades acadêmicas ao longo do curso, dando-me a força e incentivo necessários para o meu êxito profissional.

Amo vocês.

SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Local de realização.....	20
3.2. Obtenção do material.....	20
3.3. Isolamento e identificação de <i>Mycoplasma agalactiae</i>	20
3.4. Produção dos antígenos.....	20
3.5. Padronização do ELISA G.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Distribuição regional do rebanho caprino e ovino brasileiro.....	12
Tabela 1	Distribuição das amostras coletadas para isolamento de <i>Mycoplasma agalactiae</i> de acordo com o Município e a espécie animal.....	23
Tabela 2	Titulação do antígeno total e sonicado frente a soro caprino diluído 1:50 utilizando ELISA-G.....	26
Tabela 3	Titulação do antígeno total e sonicado frente a soro caprino diluído 1:100 utilizando ELISA-G.....	26
Tabela 4	Resultados percentuais das DO dos soros de coelhos hiperimunizados contra <i>Mycoplasma</i> spp.....	26
Figura 1	Municípios onde foram coletadas amostras no Estado da Paraíba.....	23
Figura 2	Municípios onde foram coletadas amostras no Estado do Rio Grande do Norte.....	24
Figura 3	Municípios onde foram coletadas amostras no Estado de Pernambuco....	24
Figura 4	Colônias de <i>M. agalactiae</i> com aspecto mamilar.....	25

RESUMO

TELES, J.A.A. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico da agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos. Patos, UFCG. 2008 27p. (Monografia – Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

O trabalho teve como objetivo reunir e apresentar os dados referentes à distribuição da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos por meio de cultivo bacteriano e desenvolver um ELISA indireto para diagnóstico desta enfermidade. *Mycoplasma agalactiae* foi identificado em 19 (9,35%) das 234 amostras provenientes caprinos e ovinos de municípios dos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. O ELISA-G foi produzido com antígeno total e sonicado de *Mycoplasma agalactiae* isolado de uma cabra naturalmente infectada. A padronização do ELISA foi feita utilizando soros caprinos de rebanhos livres e de rebanhos com diagnóstico da doença, confirmados por cultivo bacteriano. O ELISA apresentou boa capacidade de discriminação entre positivos e negativos, com razão de 46,2 e 42,8% com o antígeno sonicado e total diluídos 1/400, respectivamente. A sensibilidade, especificidade e validação do teste deve ser determinada a partir da análise de uma maior quantidade de amostras.

PALAVRAS-CHAVE: caprina, ovina, *Mycoplasma agalactiae*, diagnóstico.

ABSTRACT

TELES, J.A.A. Development and standardization of indirect ELISA for diagnosis of contagious agalactia in sheep and goat. Patos, UFCG. 2008 27p. (Monograph – Course of Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health).

This paper had as objective to present up to date about to distribution of the contagious agalactia of sheep and goats by culture and to carry on an indirect ELISA for diagnosis of this disease. *Mycoplasma agalactiae* was identified in 19 (9.35%) of the 234 goat and sheep samples which were proceeded from herds of Paraíba, Rio Grande do Norte and Pernambuco States. The ELISA-G was produced with whole and sonicated antigen from *M. agalactiae* isolated from a goat infected naturally. The standardization of ELISA was made using serum samples of free herds and infected animals, confirmed by culture. ELISA presented good capacity of discrimination between positives and negatives samples, with reason P/N of 46,2 and 42,8% when sonicated and whole antigen were diluted 1/400, respectively. Sensitivity, specificity and validation of the test should be determined from analysis of a bigger amount of samples.

KEY WORDS: goat, sheep, *Mycoplasma agalactiae*, diagnostic

1. INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro de caprinos e ovinos soma um total de mais de 20 milhões de cabeças, das quais 67,74% (14.204.312) encontram-se na região Nordeste conforme mostra o gráfico 1 (IBGE, 2006).

O Cariri paraibano adota diferentes sistemas de criação os quais variam conforme a necessidade de produção. Uma característica importante da caprinocultura regional é a existência de núcleos de rebanhos constituídos por raças exóticas, especializados na produção de leite ou carne e de animais destinados à reprodução.



Gráfico 1: Distribuição regional do rebanho caprino e ovino brasileiro.

Na região, a adoção de programas de sanidade é incipiente, o que favorece à introdução de agentes infecciosos exóticos, como o vírus da artrite-encefalite caprina, a *Brucella ovis*, Língua azul (VLA), Clostridioses e infecções por *Mycoplasma* e, conseqüentemente, a disseminação dessas enfermidades entre os rebanhos.

Em condições de campo ou quando se busca agilidade os testes clássicos são impraticáveis, devido à demora para sua conclusão. A ausência de provas rápidas para detecção de animais infectados por *Mycoplasma agalactiae* e outros *Mycoplasma* spp, sobretudo em locais de intensa aglomeração têm contribuído para a disseminação da infecção, pelo intenso trânsito entre os Estados brasileiros. Neste sentido, a utilização de testes de triagem, como a soroaglutinação em látex (LAT), para detecção de animais reagentes a *M. agalactiae* e outros *Mycoplasma* spp, poderá ser de grande utilidade. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para diagnóstico sorológico da infecção em rebanhos caprinos e ovinos, a partir da determinação da ocorrência de *M. agalactiae*, feita através de isolamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em pequenos ruminantes, as micoplasmoses representam um importante grupo de doenças, merecendo destaque a agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC), a pleuropneumonia contagiosa dos caprinos (PPCC), a ceratoconjuntivite (CCI) e as mastites. No Brasil, há relatos de isolamento de micoplasmas em animais com distúrbios respiratórios, reprodutivos, mastite, agalaxia e ceratoconjuntivite (PENHA & D'APICE, 1942; NASCIMENTO et al., 1986; MULLER et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2002; ALMEIDA NETO, 2003) e de animais assintomáticos (RIBEIRO et al., 1995; NASCIMENTO et al., 1998; ALMEIDA NETO, 2003).

Quanto a ACOC, o primeiro relato clínico foi descrito em 1816 na Itália (ZAVAGLI, 1951). Desde então, a doença se disseminou por países onde a produção de ovinos e caprinos tem importância econômica, como na região do mediterrâneo, oeste da Ásia, África e EUA (DaMASSA, 1983a; EGWU et al., 2001). No Brasil, o primeiro relato de uma cabra com agalaxia contagiosa foi registrado no Estado de São Paulo, em 1942 por PENHA & D'APICE e, desde então, a doença não foi mais descrita. Passados 60 anos, *M. agalactiae* foi isolado de caprinos leiteiros no Estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002).

Recentemente, foi isolado e identificado *M. agalactiae* através da inibição de crescimento, imunoperoxidase e PCR específica, em surtos em diversos municípios dos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (AZEVEDO, 2005). Novos surtos têm sido constatados em rebanhos que adquirem animais de outras propriedades, provocando sérios prejuízos aos produtores de leite caprino, tornando a doença endêmica em diversos municípios da região. Por ser de fácil transmissão (via aerógena, digestiva, reprodutiva, entre outras) e pelo fato dos animais de áreas livres não apresentarem defesa específica, a infecção se dissemina rapidamente entre os rebanhos (TOLA et al., 1997).

Clinicamente, a ACOC se manifesta com mastite, seguida de agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite. Os sinais clínicos não são típicos, mas a súbita redução na produção de leite pode ser um indicativo da infecção, devendo-se isolar o microrganismo dos animais doentes para estabelecer o diagnóstico definitivo. O agente etiológico da doença é o *M. agalactiae*. Entretanto, outras espécies podem estar envolvidas, como o *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. capricolum* subsp. *capricolum* (LEVISOHN et al., 1991; EGWU et al., 2001), *M. mycoides* subsp. *capri* (REAL et al. 1994) e *M. putrefaciens* (EGWU et al., 2001;

GIL et al., 2003). Este último produz sinais clínicos semelhantes ao *M. agalactiae* em caprinos (MADANAT et al., 2001).

A infecção se dá por via oral, respiratória ou mamária. Na infecção oral, primeiramente há a aderência da bactéria às células epiteliais da mucosa e em seguida a invasão do intestino delgado, com possibilidade de isolamento a partir de swab retal. Após um período de bacteremia acompanhado de febre, há disseminação para órgãos (olhos, glândula mamária, articulações, tendões e linfonodos). A ordenha realizada sem higienização adequada facilita a transmissão entre os animais, através das mãos dos ordenhadores (BERGONIER et al., 1997). Infecção respiratória experimental tem sido obtida através da inoculação de culturas puras de *M. agalactiae* por via intra-traqueal. Animais inoculados pela mesma via com *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC a partir de pulmão, fígado, baço e linfonodos, deixaram de se alimentar no terceiro dia e apresentaram descarga nasal serosa a muco-purulenta, chegando a óbito no sétimo dia pós-infecção, sem lesões típicas de pneumonia, mas com reisolamento de. (SINGH et al., 2004).

Excreções e secreções contêm microrganismos que podem infectar rapidamente todo o rebanho, principalmente através do colostro e leite de fêmeas infectadas (REAL et al., 1994; KINDE et al., 1994). Rebanhos livres desenvolvem sintomatologia clássica de ACOC após introdução do agente, tornando-se cronicamente infectados ou assintomáticos, o que favorece a disseminação da infecção para outros animais e rebanhos. Há evidências do papel de ácaros do conduto auditivo externo (*Railettia capri* e *Psoroptes cuniculli*) de caprinos e ovinos como responsáveis pela manutenção de *Mycoplasma* spp no rebanho (DaMASSA, 1983b; RIBEIRO et al., 1995).

O período de incubação da ACOC varia de uma a oito semanas, dependendo da quantidade de microrganismos, virulência da amostra e resistência do hospedeiro. Os primeiros casos apresentam evolução aguda com febre passageira, redução abrupta da produção de leite, agalaxia e mastite uni ou bilateral. A coloração do leite pode variar desde claro (aquoso) a amarronzado com grumos ou se apresentar com aspecto purulento, impróprio para o consumo e para a indústria de laticínios. O odor não é alterado, porém, quando há presença de *M. putrefaciens* ou de outras bactérias produtoras de gases, observa-se um odor pútrido (TULLY et al., 1974). Associado ou não, os animais podem desenvolver pleurite, pericardite, peritonite, meningite serosa e/ou fibrinosa e uma artrite com exsudato fibrino-purulento (NASCIMENTO et al., 1986; SMITH & SHERMAN, 1994; RUFFIN, 2001; TABOSA et al., 2002). Casos clínicos de agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes são

responsáveis pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite (CORRALES et al., 2004).

Poliartrite é observada em animais de todas as idades e as articulações do carpo e tarso são as mais afetadas. As articulações podem conter líquido de aspecto fibrino-purulento e este varia de transparente a amarelado (DaMASSA et al., 1984). A punção do líquido promove uma sensação de alívio ao animal. Quando mais de uma articulação está envolvida, a perda de peso é acentuada, podendo levar à morte por inanição, devido à incapacidade de locomoção.

Casos de mastite crônica, septicemia, artrite, cerato-conjuntivite e pneumonia foram relatados por Real et al. (1994) em caprinos infectados por *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri*. Gil et al. (2003) relatam a ocorrência de salpingites descamativa, metrite catarral cística e degeneração testicular em caprinos com ACOC de um rebanho comercial na região de Extremadura, sudeste da Espanha. Apesar de *M. agalactiae* e *M. putrefaciens* terem sido isoladas de vários órgãos, apenas *M. putrefaciens* foi isolada de lesões genitais.

Na micoplasmose septicêmica acrescenta-se ainda, as lesões de infarto renal, necrose focal esplênica com depleção da polpa branca e linfadenite. Microscopicamente, a glândula mamária revela um infiltrado inflamatório mononuclear envolvendo os ácinos e ductos. A cápsula articular apresenta exsudado fibrino-purulento com áreas de necrose, edema e numerosos microabscessos, podendo-se observar ainda vasculites e trombozes com infiltrados perivasculares de macrófagos (SMITH & SHERMAN, 1994; TABOSA et al., 2002; CORRALES et al., 2004).

Infecções por *Mycoplasma* spp. resultaram em exsudato pleural de coloração amarelada e pequenas áreas de consolidação no pulmão, principalmente nos lobos apical e cardíaco, com discreta aderência à parede pleural (CASTRO et al., 1989).

Quadro respiratório decorrente da infecção por *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e por *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (REAL et al., 1994; KUSILUKA et al., 2001) em caprinos cursa com febre, tosse, dispnéia, descarga nasal, lacrimejamento, opacidade de córnea, artrite, laminite, depressão e prostração. Nos animais jovens os sinais clínicos são mais severos que nos adultos e a taxa de mortalidade pode atingir 90% (DaMASSA et al., 1983c). As mortes eventualmente ocorrem entre três e oito dias, mas mortes súbitas também podem ser observadas. Cerato-conjuntivite causada por *Mycoplasma* spp é a principal doença infecciosa do globo ocular dos pequenos ruminantes.

Na Noruega, *M. conjunctivae* foi isolado em 37% dos ovinos que apresentavam CCI e em 8% dos animais sem sinais clínicos. *Branhamella ovis* e outras bactérias também estavam

presentes e o papel desses microrganismos no processo infeccioso deve ser investigado (AKERSTEDT & HOFSHAGEN, 2004). O caráter multi-fatorial para a apresentação clínica de cerato-conjuntivite deve ser considerado, pois é comum mais de um microrganismo estar envolvido na infecção (REAL et al., 1994; AYLING et al., 2004; ALMEIDA NETO et al., 2004).

Fatores predisponentes como estação do ano, presença de moscas, idade do animal e traumatismos parecem contribuir para a ocorrência da infecção, mas a presença da bactéria é determinante na gravidade da doença. Clinicamente, a infecção evolui com lacrimejamento, hiperemia da conjuntiva, descarga ocular catarral a mucopurulenta com aglutinação de pêlos da região periocular, blefaroespasmos e opacidade de córnea. Nos casos mais graves, observa-se vascularização corneana, ceratite ulcerativa superficial ou profunda, febre, artrites, hipópio e hifema (ALMEIDA NETO, 2003).

O impacto econômico mais acentuado advém da queda ou ausência na produção de leite, que se instala rapidamente e pode atingir 100% do rebanho em uma semana. O elevado custo para o controle da doença nos rebanhos também é visto como um significativo impacto econômico (ALCÂNTARA et al., 2003). As taxas de morbi-mortalidade podem variar de acordo com a imunidade do rebanho acometido. Mortalidade em torno de 90% em animais jovens e de 5% em adultos foi relatada por Azevedo et al. (2002) no Brasil. Na Espanha, Gil et al. (2003), descreveram um surto em rebanho constituído por 100 animais adultos (95 fêmeas e cinco machos) e 60 jovens. No período de duas semanas, 84% das fêmeas apresentaram sinais clínicos (mastite aguda, agalaxia, artrite ou poliartrite e ceratoconjuntivite), sendo que 48% morreram; outras 32 cabras foram sacrificadas por apresentarem quadro clínico extremo. Entre os cabritos, o sinal clínico predominante foi poliartrite e prostração e a taxa de mortalidade foi de 82%.

Diante das perspectivas econômicas da ovinocaprinocultura e face à necessidade de normatizar as exigências sanitárias nas relações entre os Estados da federação no que se refere à sanidade ovina e caprina, foi criado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos - PNSCO (IN N° 87, de 2004), que tem como objetivo “Realizar vigilância epidemiológica e sanitária para as doenças de caprinos e ovinos no Brasil, por meio de ações definidas pelo DDA e executadas pelos Serviços Oficiais e médicos veterinários privados”. Em conexão com o PNSCO já foi normatizado o cadastro sanitário de estabelecimento de criação (IN N° 20, de 2005).

Após estudo e ampla discussão sobre a importância atual, foram definidas as enfermidades que seriam contempladas com legislação específica do PNSCO, selecionadas com base na lista da OIE. Considerando a situação epidemiológica no território nacional, a disponibilidade de recursos tecnológicos para diagnóstico e estabelecimento de medidas concretas de controle, foram elaborados e submetidos à consulta pública três Planos Nacionais de Vigilância e Controle: Epididimite Ovina (*Brucella ovis*), Lentivirose de Pequenos Ruminantes e Paraplexia Enzoótica dos Ovinos (Scrapie). Os Planos objetivam controlar ou erradicar as doenças, certificar criações livres, cadastrar Médicos Veterinários, promover a educação sanitária e agregar valor aos produtos da ovinocaprino cultura. Entretanto, não foi incluído o Plano de Vigilância e Controle da Agalaxia Contagiosa, pela ausência de vacinas e kits para diagnóstico no país (CASTRO, 2006).

O diagnóstico clínico das micoplasmoses é presuntivo, tendo em vista a variedade de microrganismos que podem causar distúrbios semelhantes. No entanto, algumas micoplasmoses específicas, como a ACOC, podem ser diagnosticadas quando o conjunto dos sinais clínicos está presente. Quando não, é preciso auxílio laboratorial para estabelecer o diagnóstico etiológico pelo cultivo e isolamento de *Mycoplasma* spp. e por outros métodos diagnósticos (MADANAT et al., 2001; TOLA et al., 2001; FLEURY et al., 2002).

Tradicionalmente, o aparecimento de colônias com aspecto de “ovo frito” ou mamilar, em associação com o perfil bioquímico dos isolados continuam sendo úteis para definição dos agentes envolvidos, sendo, portanto, o método padrão para diagnóstico laboratorial. Meios seletivos (PPLO caldo e Agar, Hayflick, SP4 e outros) contendo penicilina e acetato de tálio são os mais frequentemente utilizados (DARZI et al., 1998; RODRIGUEZ et al. 2002). A identificação de espécies pode ser feita por meio de provas bioquímicas e inibição de crescimento (IC), utilizando anti-soros de referência (COTTEW et al., 1968; STALHEIM & STONE, 1976; BANERJE et al., 1979).

A identificação de proteínas estruturais e a resposta imunológica induzida por elas tem sido uma ferramenta importante no diagnóstico de infecções por micoplasmas. Tola et al. (2001) caracterizaram e sequenciaram uma lipoproteína de membrana com 80 kDa (P80) de *M. agalactiae* isolado de leite caprino com agalaxia contagiosa. Anticorpos anti-P80 foram detectados na fase inicial da infecção, mas a função desta proteína ainda deve ser esclarecida. Fleury et al. (2002) revelaram uma proteína com 30 kDa associada à membrana de *M. agalactiae*, amostra PG2. Das 27 amostras pesquisadas, 20 apresentaram P30 e foram comuns aos sorotipos A, B, C e D. As demais amostras, destituídas de P30, foram classificadas nos

sorotipos E, F, G e H. A P30 induziu uma resposta imune que permaneceu crescente até 21 e 61 dias, quando analisadas por ELISA e imunoblotting, respectivamente.

Outra proteína de 40 kDa, também associada à aderência de *M. agalactiae* PG2, foi identificada por Fleury et al. (2002) que confirmaram sua participação como mediadora desse evento, pois ao utilizarem anticorpos anti-P40 inibiram significativamente a aderência de *M. agalactiae* PG2 às células sinoviais de ovinos. Soros de ovinos experimentalmente infectados apresentaram forte e persistente resposta imune durante três meses pós infecção quando analisados por imunoblotting e ELISA. A P40 é específica de *M. agalactiae*, pois espécies de *Mycoplasma* estreitamente relacionadas não apresentaram resposta quando analisadas por southernblotting. Soro monoespecífico anti-P40 produzido em coelho reagiu com uma proteína com peso molecular de 37 kDa de *M. agalactiae* PG2 e de outras 22 amostras de *M. agalactiae* isoladas em diferentes países da Europa.

Métodos sorológicos têm sido rotineiramente utilizados, no entanto, eventualmente, há necessidade de comprovação por meio de técnicas mais específicas, em virtude de reações cruzadas entre amostras estreitamente relacionadas, podendo levar a diagnóstico incorreto (ROSENGARTEN & YOGEV, 1996). Outra desvantagem dos métodos sorológicos é a necessidade de diferentes tipos de soros para se estabelecer a comparação frente ao antígeno que se deseja identificar, o que dificulta seu emprego na rotina diagnóstica.

A sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos também podem ser influenciadas pela qualidade e pureza dos antígenos e pela semelhança antigênica das amostras, resultando em reações cruzadas. Uma das alternativas para solucionar este evento é a melhoria da qualidade dos antígenos, o que pode ser obtido a partir da separação de proteínas específicas para cada microrganismo (BELLOY et al. 2001; MARCH et al., 2003).

Pepin et al. (2003) ao compararem três ELISA para diagnóstico de ACOC, constataram que o ELISA produzido pela Agência Francesa de Segurança Sanitária dos Alimentos apresentou resultados falsos positivos e falsos negativos. A especificidade do teste oficial foi de 48%, enquanto dois kits comerciais apresentaram especificidade de 88% e 92%. A sensibilidade de todos os testes foi de 100%. Assunção et al. (2004) utilizaram um ELISA para levantamento sorológico em 204 rebanhos caprinos das Ilhas Canárias e demonstraram que 55% e 67% dos animais apresentaram anticorpos para *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, respectivamente. O teste apresentou 99% de sensibilidade e 78% de especificidade para *M. agalactiae*. O antígeno foi produzido a partir de amostras locais e provavelmente foi isso que resultou em uma alta sensibilidade do teste, pois *M. agalactiae* apresenta uma intensa variabilidade entre as amostras isoladas em diferentes países.

O teste de inibição de crescimento e a reação de imunoperoxidase são empregados no diagnóstico das micoplasmoses, tendo como principal vantagem o baixo custo de realização, além de boa sensibilidade e especificidade (IMADA et al., 1987). Diversas técnicas sorológicas têm sido padronizadas para identificação de micoplasmas, entre as quais destacam-se ELISA, imunoperoxidase, imunofluorescência, imunodifusão, hemaglutinação, soro-aglutinação, entre outras.

Técnicas imunoenzimáticas e de biologia molecular podem ser utilizadas para diagnóstico definitivo das micoplasmoses. Assunção et al. (2004) desenvolveram um ELISA para levantamento sorológico em 204 rebanhos caprinos das Ilhas Canárias e demonstraram que 55% e 67% dos animais apresentaram anticorpos para *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, respectivamente. O teste apresentou 99% de sensibilidade e 78% de especificidade para *M. agalactiae*. O antígeno foi produzido a partir de amostras locais e provavelmente foi isso que resultou em uma alta sensibilidade do teste, pois *M. agalactiae* apresenta uma intensa variabilidade entre as amostras isoladas em diferentes países.

Infecção subclínica e animais portadores foram identificados por Levisohn et al. (1991), ao utilizarem um ELISA produzido com soro monoespecífico de coelho hiperimunizado. A especificidade do ELISA para *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC foi comparada com imunoblotting e isolamento em dois rebanhos caprinos em condições de campo. Os resultados indicaram a aplicabilidade do ELISA, podendo ser utilizado para auxiliar nos procedimentos de controle.

Para melhorar a especificidade da sorologia, Zendulková et al. (2004) produziram um ELISA com Ac-M para detecção de *M. agalactiae* em swabs nasal, conjuntival, vaginal e do conduto auditivo externo de caprinos e ovinos da República Tcheca e Jordânia, obtendo-se resultados positivos em 11% e inconclusivos em 10% dos animais provenientes da Jordânia. Todas as amostras da República Tcheca foram negativas.

Os testes sorológicos são empregados no diagnóstico das micoplasmoses, tendo como principal vantagem o baixo custo de realização, além de boa sensibilidade e especificidade, entre as quais destaca-se ELISA, imunoperoxidase, imunofluorescência, imunodifusão, hemaglutinação, soro-aglutinação. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo descrever a produção e padronização de um ELISA com proteína G para o diagnóstico de ACOC, a partir da determinação da ocorrência de *M. agalactiae*, feita através de isolamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Vacinas e Diagnóstico - LAVADI, vinculado à Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande – PB e no Laboratório de Viroses da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

3.2. Obtenção do material

Foram utilizadas 234 amostras (152 de leite, 53 de swab nasal, seis de swab ocular e 23 de líquido articular), coletadas em 199 caprinos e quatro ovinos pertencentes a rebanhos com sinais clínicos de agalaxia contagiosa nos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. As amostras de leite, swab nasal e ocular foram coletadas e acondicionadas em tubos de ensaio estéreis contendo 4 mL de solução salina glicerinada a 50% com 2000UI/mL de penicilina. O líquido articular foi coletado por punção da articulação, utilizando seringa descartável estéril, e transferido para tubos de ensaio contendo igual volume da solução salina glicerinada, acondicionadas em caixas isotérmicas, enviadas ao laboratório e armazenadas a -20°C até o momento do processamento.

3.3. Isolamento e identificação de *Mycoplasma agalactiae*

O isolamento de *M. agalactiae* foi realizado em meio Hayflick modificado, sólido e líquido, com identificação da amostra através de provas bioquímicas, imunoperoxidase indireta modificada, com confirmação através de PCR conforme descrito por Azevedo et al. (2006).

3.4. Produção dos antígenos

Para a produção dos antígenos, uma colônia de *M. agalactiae* foi recortada do meio sólido e transferida para 3mL de meio líquido, incubada por 48 horas, repicada para 30mL e posteriormente para 1.000mL com intervalo de incubação de 96 horas. A determinação de

unidades formadoras de colônia (UFC)/mL foi realizada através de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em meio líquido e semeadura em meio sólido, com leitura após 96 horas de incubação. O cultivo foi centrifugado a 3.800g a 8°C durante duas horas e lavado três vezes em tampão fosfato (PBS), pH 7,6. O *pellet* obtido foi ressuspenso em solução tampão carbonato 0,1M, pH 9,6 até a concentração final de 24 vezes (antígeno total). Parte deste produto foi submetido à sonicação de baixa intensidade em meio líquido por 20 minutos (antígeno sonicado).

A concentração proteica dos antígenos foi determinada através da técnica descrita por Bradford modificada por Sedmak e Grossberg (1977), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5. Padronização do ELISA-G

Para a padronização do ELISA-Gt (utilizando o antígeno total) e ELISA-Gs (antígeno sonicado), as concentrações dos antígenos e diluições dos soros foram definidas de forma a se obter as melhores condições de diferenciação entre soros positivos e negativos. Assim, o antígeno total (0,96µg/mL, 0,48µg/mL, 0,24µg/mL, 0,12µg/mL e 0,06µg/mL) e o sonicado (1,08µg/mL, 0,54µg/mL, 0,27µg/mL, 0,135µg/mL e 0,067µg/mL) foram concentrados seriadamente em solução tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 e titulados frente à diluição de 1:50 e 1:100 de seis soros positivos e seis negativos para ACOC. O conjugado de proteína-G peroxidase¹ foi utilizado de acordo com recomendações do fabricante.

O ELISA foi realizado utilizando placas de poliestireno de 96 poços² 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; as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, 100µL do conjugado de proteína G-peroxidase diluído 1:90.000 foram distribuídos 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, 100µL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,1mg de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) por mL e 0,02% de peróxido de hidrogênio (v/v) foram

¹ Sigma-Aldrich, USA

² Nunc- Immuno Plate Maxisorp Surface; NUNC Brand Products, Dinamarca

adicionados. 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.

Como controle positivo foi usado um soro de um caprino com sinais clínicos de ACOC, naturalmente infectado por *M. agalactiae*, confirmado pelo isolamento e PCR. Para calcular a razão P/N, foram utilizados 06 soros positivos de caprinos com sinais clínicos de ACOC, também confirmados por isolamento de *M. agalactiae* e 06 soros negativos de caprinos de rebanhos onde não havia sinais clínicos da enfermidade nem crescimento no cultivo de micoplasmas. Além disso, para avaliar a especificidade do teste, foram testados soros de coelhos hiperimunizados contra *M. capricolum*, *M. arginini*, *M. putrefaciens* e *M. agalactiae* (Gentilmente cedidos pelo Prof. Elmiro Rosendo Nascimento da Universidade Federal Fluminense).

O resultado de cada soro testado foi expresso como percentagem da DO média de três repetições do soro controle positivo, resultando em uma escala contínua de zero a 100%. Resultados negativos ou superiores a 100%, foram considerados zero e 100% respectivamente (CASTRO et al., 1999). Para estimativa preliminar do ponto de corte considerou-se a média dos percentuais de 40 caprinos negativos mais três desvios-padrão (LETESSON et, al., 1997; CASTRO, 1998). Os soros utilizados foram colhidos de seis cabritos recém nascidos, obtidos por parto induzido com separação imediata da cabra e alimentação com colostro artificial, de dois caprinos adultos do arquipélago de Fernando de Noronha, área sem registro de ACOC, e de 32 caprinos adultos, de um rebanho monitorado para ACOC, sem sinais clínicos da enfermidade, nem crescimento no cultivo de micoplasmas.

A repetibilidade do teste foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação entre cinco repetições, utilizando seis soros negativos e seis positivos, conforme recomendações da OIE (2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 234 amostras, foi possível o isolamento de *Mycoplasma agalactiae* em 19 (9,35%), sendo que 04 (1,96%) foram provenientes de ovinos e 15 (7,38%) de caprinos dos três estados estudados (tabela 1, figuras 1 a 3).

Tabela 1. Distribuição das amostras coletadas para isolamento de *Mycoplasma agalactiae* de acordo com o Município e a espécie animal. Patos, 2007.

Município/ Estado	Estado	Espécie animal	Nº de animais	Material coletado*	Resultado
Cabaceiras	PB	Caprina	07	S	Negativo
Barra de Santa Rosa		Caprina	25	L; SN; SO; LA; S	Positivo
Gurjão		Caprina	06	L	Negativo
Livramento		Caprina	05	L; SN	Negativo
Prata		Caprina	22	L; S	Negativo
Santa Terezinha		Caprina	13	L	Negativo
Soledade		Caprina	04	L	Negativo
Taperoá		Caprina e Ovina	16	L; SN; SO; LA; S	Positivo
Cruzeta		RN	Caprina	07	L
Currais Novos	Caprina		16	L; SO; LA	Positivo
Macaíba	Caprina		06	L; LA	Negativo
Gravatá	PE	Caprina	09	L; SN; LA	Negativo
Garanhuns		Ovina	02	LA	Positivo

*L = Leite; SN = Swab Nasal; SO = Swab Ocular; LA = Líquido Articular; S = Soro.

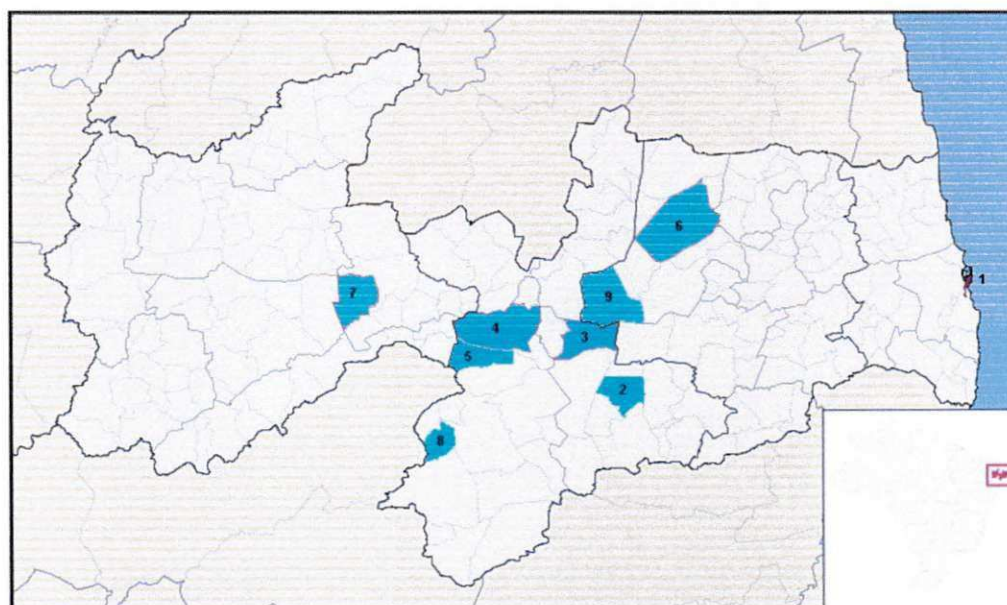


Figura 1: Municípios onde foram coletadas amostras no Estado da Paraíba. 1. João Pessoa; 2. Cabaceiras; 3. Gurjão; 4. Taperoá; 5. Livramento; 6. Barra de Santa Rosa; 7. Santa Terezinha; 8. Prata; 9. Soledade.

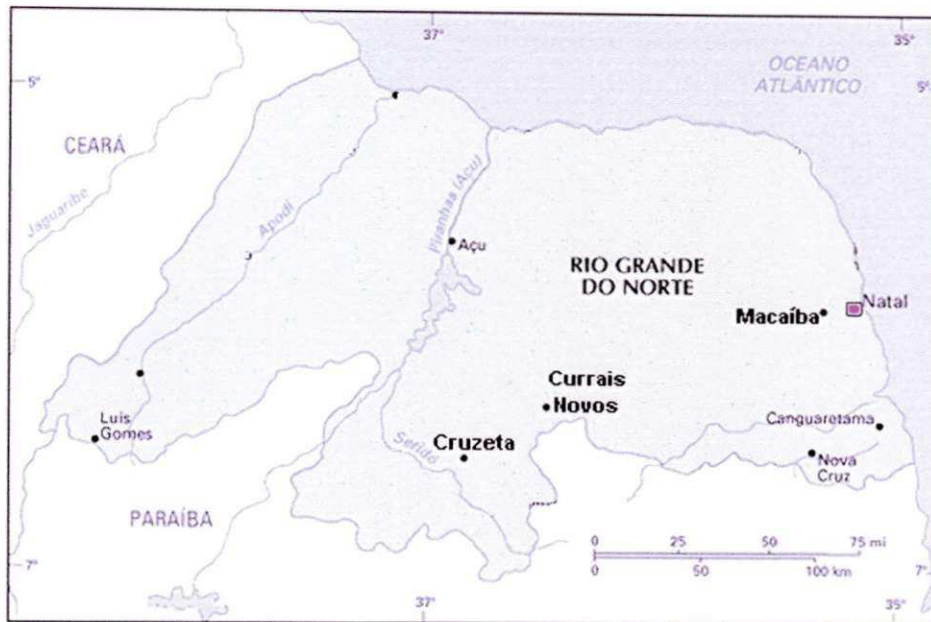


Figura 2: Municípios onde foram coletadas amostras no Estado do Rio Grande do Norte.

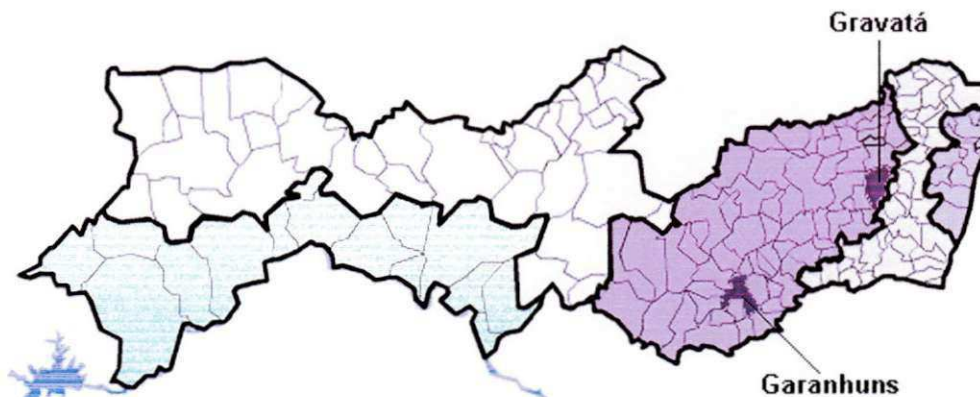


Figura 3: Municípios onde foram coletadas amostras no Estado de Pernambuco.

Pode-se afirmar que a doença continua disseminando-se na região, fato constatado pelo surgimento de animais com sinais clínicos e identificação de *Mycoplasma* spp na microrregião do Curimataú - PB, no Município de Currais Novos - RN e em Garanhuns - PE que até então, não apresentavam registros da doença conforme os resultados que são apresentados na tabela 1. O material coletado dos quatro ovinos foi positivo. Este fato deve ser analisado com certo cuidado, pois as amostras foram coletadas, exclusivamente, em 04 animais com sintomatologia clínica e estas encaminhadas ao laboratório. No entanto, os demais animais do rebanho não foram submetidos a exames laboratoriais.

Azevedo et al. (2006) relataram o primeiro isolamento de *M. agalactiae* no Brasil em animais com e sem sinais clínicos e já alertavam para a disseminação da infecção para outros rebanhos do Nordeste, tendo em vista o alto grau de trânsito e comercialização destes animais em feiras, exposições entre os Estados. Outras espécies de *Mycoplasma* tem sido isoladas de animais no Brasil. Almeida Neto et al., (2004) isolaram *M. conjunctivae* de ovinos saudáveis e com cerato-conjuntivite no estado de Pernambuco e Gregory et al. (2003) em caprinos naturalmente infectados no estado de São Paulo.

As amostras de swab nasal e ocular apresentaram maior taxa de contaminação por fungos e bactérias. Este achado mostra a necessidade de filtrar essas espécimens em membranas de 0,22 µm de diâmetro antes do cultivo inicial.

Quanto ao leite, os isolamentos comprovam a alta carga bacteriana neste material clínico, sobretudo quando os animais apresentam mastite. Tola et al. (1997) descreveram que é possível a detecção de apenas cinco unidades de *M. agalactiae* em cada mL de leite quando utilizou a reação em cadeia da polimerase para a pesquisa. Por outro lado, Madanat et al. (2001) relataram o isolamento de *M. agalactiae* em cabras mesmo quando não apresentavam sinais clínicos evidentes por um período de oito anos.

O crescimento de colônias foi observado após aproximadamente 72 a 96h de incubação. Os repiques para o meio líquido foram feitos após observação do crescimento bacteriano no meio sólido objetivando isolar apenas *Mycoplasma* spp.

Os antígenos foram produzidos a partir de cultivos de *M. agalactiae*, cujas colônias tinham aspecto de “ovo frito”, produziram filmes e manchas e não fermentaram glicose nem degradaram arginina (Fig. 4). Após 96 horas de incubação, o cultivo apresentou $5,5 \times 10^7$ UFC/mL de meio. As concentrações protéicas médias dos antígenos foram de 48 µg/mL para o antígeno total e de 54 µg/ml para o sonicado.

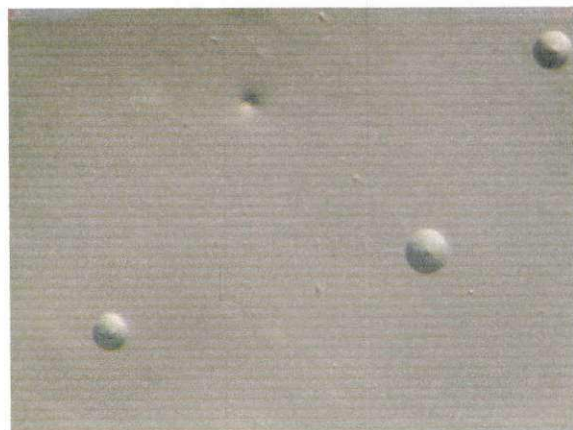


Figura 4. Colônias de *M. agalactiae* com aspecto mamilar.

Utilizando as concentrações de 0,12 µg/mL do antígeno total e de 0,13 µg/mL do antígeno sonificado, equivalentes a diluição 1/400 dos antígenos, com os soros diluídos 1/100, obteve-se uma intensa discriminação dos positivos e negativos, com razão de 46,2 e 42,8% respectivamente. A média das densidades óticas (DO) do soro controle positivo foi $0,682 \pm 0,016$ e $0,650 \pm 0,037$ para o antígeno total e sonificado respectivamente. O ponto de corte preliminarmente estimado foi de 7,66% para o ELISA-Gt e de 5,9% para o ELISA-Gs. O ELISA-Gt apresentou coeficiente de variação interplacas de 4,2% e o ELISA-Gs de 5,1%.

Entre os antígenos testados não houve diferença significativa entre os valores da razão P/N, demonstrando ótima capacidade de discriminação de ambos os antígenos, como descrito nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Titulação do antígeno total e sonificado frente a soro caprino diluído 1:50 utilizando ELISA-G.

Antígeno	Razão P/N ¹				
	Diluição do Antígeno				
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
Total	14,2	21,8	30,9	38,7	35,6
Sonificado	15,5	22,4	31,3	37,5	32,7

¹ Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo, diluídos 1:50.

Tabela 3 - Titulação do antígeno total e sonificado frente a soro caprino diluído 1:100 utilizando ELISA-G.

Antígeno	Razão P/N ¹				
	Diluição do Antígeno				
	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800
Total	15,7	27,5	38,1	46,2	43,3
Sonificado	13,6	25,6	34,5	42,8	37,2

¹ Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo, diluídos 1:100.

Os ELISA quando testados frente aos soros hiperimunes de coelhos contra *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. capricolum*, *M. putrefaciens* apresentaram reações positivas nos três primeiros e reação negativa para *M. putrefaciens*, como representado na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados percentuais das DO dos soros de coelhos hiperimunizados contra *Mycoplasma* spp.

Antígeno ¹	DO dos soros de coelhos ² (%)				
	Cut-off ³	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. putrefaciens</i>
Total	7,66	136,74	17,37	22,77	0,35
Sonificado	5,90	142,26	15,04	19,20	0,00

¹ Antígenos diluídos 1:400 ² soros de coelhos diluídos 1:100 ³ "Cut-off" relativo

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que:

- 5.1 A infecção por *M. agalactiae* continua disseminando-se na região Nordeste;
- 5.2 O ELISA pode ser uma ferramenta para diagnóstico sorológico da micoplasmose, tendo maior sensibilidade relativa e nível de concordância do ELISA-Gs quando comparado ao ELISA-Gt;
- 5.3 Maior quantidade de soros deve ser testada para determinar a sensibilidade e especificidade dos testes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERSTEDT, J.; HOFSHAGEN, M. Bacteriological investigation of infectious keratoconjunctivitis in Norwegian sheep. **Acta Vet. Scand.**, v. 45, n.1-2, p.19-26, 2004.

ALCÂNTARA, M.D.B.; AZEVEDO, E.O.; FARIAS, A.A.; TABOSA, I.M.; ARAÚJO, M.D.; SANTOS, F.A.; NASCIMENTO, E.R.; CASTRO, R.S. Indução de parto e separação das crias para controle da agalaxia contagiosa em caprinos. In: **Cong. Latinamer. Buiatria.**, XI, 2003, Salvador. p. 71.

ALMEIDA NETO, J.B.; SÁ, F.B.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J.; MOTA, R.A.; ALMEIDA, M.Z. Ocorrência de *Mycoplasma conjunctivae* em ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa, no Estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.** v. 71, n. 1, p. 79-81, 2004.

ALMEIDA NETO, JOSÉ BEZERRA DE. **Estudo clínico, citológico e bacteriológico conjuntival de ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa.** Recife, PE, 2003. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ASSUNÇÃO, P.; DE LA FE, C.; RAMIREZ, A.S.; ANDRADA, M.; POVEDA, J.B. Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. **Vet. Rec.** v. 154, p. 684-687, 2004.

AYLING, R.D.; BASHIRUDDIN, S.E.; NICHOLAS, R.A. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **Vet. Rec.** v. 155, n. 14, p. 413-416, 2004.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.M.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.D.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 576-581, 2006.

AZEVEDO, EDISIO OLIVEIRA DE. **Aspectos clínicos, microbiológicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) no Brasil.** Recife, PE, 2005 Originalmente apresentada como tese de doutorado em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A.; CASTRO, R.S.; CAMPOS, C.A.M. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in

dairy goats in Brazil. Epidemiologic findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B. Perfil sanitário e zootécnico de rebanhos caprinos nas microrregiões do Cariri paraibano. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.** v. 59, p.1597-1600, 2007.

BANERJEE, M.; SINGHI, N.; GUPTA, P.P. Isolation of Mycoplasmas and Acholeplasmas from pneumonie lesions in sheep and goats in India. **Zbl. Vet. Med. B.**, n. 26, p. 689-695. 1979.

BARILE, M. F.; DEL GIUDICE, R. A.; TULLY, J. G. Isolation and Characterization of *Mycoplasma conjunctivae* sp. n. from Sheep and Goats with Keratoconjunctivitis. **Infect. Immun.** v. 5, n. 1, p. 70-76, 1972.

BELLOY, L.; GIACOMETTI, M.; ABDO, E.M.; NICOLET, J.; RAWINKLER, M.; JANOVSKY, M.; BRUDERER, U.; FREY, J. Detection of specific *Mycoplasma conjunctivae* antibodies in the sera of sheep with infectious keratoconjunctivitis. **Vet. Res.**, v. 32, n. 2, p. 155-164, 2001.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Rev. Sci. Tech. OIE**, v. 16, p. 848-873, 1997.

BROWN, C. La importancia de las enfermedades emergentes para la sanidad animal, la salud pública y el comercio. **OIE**, 2001.

CASTRO, R. S. Política oficial em sanidade ovina no Brasil. XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Cuiabá, 2006.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M., GOUVEIA, A.M.G. A labelled avidin- biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis vírus in goats sera. **Vet. Res. Commun.**, v.23, p.512-522, 1999.

CASTRO, ROBERTO SOARES DE. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios filogenéticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas.** Belo Horizonte, MG, 1998 Originalmente apresentada como tese de doutorado em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, R.S.; PESSOA, A. L. P.; MAIA, F. C. L.; TABOSA, H. C.; CAVALCANTE, M. I. & BARROS, M. S. R. M. Micoplasmoses em reprodutores empregados em programa de melhoramento genético no Estado de Pernambuco, Brasil. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v. 41, p. 247-256, 1989.

CORRALES, J.C.; SANCHEZ, A.; LUENGO, C.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell count in Murciano-Granadina goat herds. **J. Dairy Sci.**, v. 87, n. 10, p. 3165-3171, 2004.

COTTEW, G.S.; WATSON, W.A.; ARISOY, F.; ERDAG, O.; BUCKLEY, L.S. Differentiation of *Mycoplasma agalactiae* from the other Mycoplasmas of sheep and goats. **J. Comp. Path.**, v. 78, p. 275-282, 1968.

DaMASSA, A. J. Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goat milk. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 183, n. 5, p. 548-549, 1983a.

DaMASSA, A.J. Prevalence of *Mycoplasmas* and mites in the external auditory meatus of goats. **Calif. Vet.**, v. 37, n. 10, p. 13-17, 1983b.

DaMASSA, A.J.; BROOKS, D.L.; ADLER, H.E. Caprine mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (LC). **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 322-325, 1983c.

DAMASSA, A.J.; BROOKS, D.L.; HOLMBERG, C.A. Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 20, p. 975-978, 1984.

DARZI, M. M.; SOOD, N.; GUPTA, P. P.; BANGA, H. S. The pathogenicity and pathogenesis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (F38) in the caprine mammary gland. **Vet. Res. Commun.** v. 22, n. 3, p. 155-165, 1998.

EGWU, G.O.; AMEH, J.A.; ALIYU, M.M.; MOHAMMED, F.D. Caprine mycoplasmal mastitis in Nigeria. **Small Rum. Res.**, n. 39, p. 87-91, 2001.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; PETERHANS, E.; FREY, J. VILEI, E. M. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5612-5621, 2002.

GIL, M.C.; PEÑA, F.J.; MENDOZA, J.H.; GOMEZ, L. 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, 2003.

GREGORY, L.; CARDOSO, M.V.; BIRGEL Jr, E.H.; TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, R.M.; PACHECO, W.A.; BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 199-201, 2003.

IBGE. Censo Agropecuário 2006. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>. Acessado em: 02/01/2008.

IMADA, Y., UCHIDA, I., HASHIMOTO, K. Rapid identification of *Mycoplasma* by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. **J. Clin. Microbiol.**, 25, 17-21, 1987.

KINDE, H.; DAMASSA, A.J.; WAKENELL, P.S.; PETTY, R. *Mycoplasma* infection in a commercial goat dairy caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (caprine biotype). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 6, n. 4, p. 423-427, 1994.

KUSILUKA, L.J.; OJENIYI, B.; FRIIS, N.F.; KOKOTOVIC, B.; AHRENS, P. Molecular analysis of field strains of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* and *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, small colony type isolated from goats in Tanzania. **Vet. Microbiol.**, v. 82, n. 1, p. 27-37, 2001.

LETESSON, J.J.; TIBOR, A.; VAN EYNDE, G.; WANSARD, V.; WEYNANTS, V.; DENOEL, P.; SAMAN, E. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4, n.5, p.556-564, 1997.

LEVISOHN, S.; DAVIDSON I, CARO VERGARA, M.R.; RAPOPORT, E. Use of an ELISA for differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *M. mycoides* subspecies *mycoides* (LC) in naturally infected goat herds. **Res. Vet. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 66-71, 1991.

MACHADO, LUIZ CARLOS PINHEIRO. **Pastoreio Racional Voisin: tecnologia agroecológica para o 3º milênio**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2004. 310 p.

MADANAT A., ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. **Acta Vet. Brno.**, v. 70, p. 403-412, 2001.

MARCH, J.B.; KERR, K.; LEMA, B. Rapid detection of contagious bovine pleuropneumoniae by a *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC capsular polyssacharide-specific antigen detection latex agglutination test. **Clin. and Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 233-240, 2003.

McCAULEY, E.H.; SURMAN, P.G.; ANDERSON, D.R. Isolation of *Mycoplasma* from goats during an epizootic of keratoconjunctivitis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, n. 6, p. 861-870, 1971.

MEIRELLES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; DA SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; LANGONI, H. Monitoramento microbiológico e avaliação de provas diagnósticas na mastite caprina. **Rev. NAPGAMA**, n. 6, p. 17-19, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 20, DE 15 DE AGOSTO DE 2005. Aprova os Procedimentos para Operacionalização do Cadastro Sanitário de Estabelecimentos de Criação de Caprinos e Ovinos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13032>. Acessado em 04/04/2006.

MULLER, E.E.; NASCIMENTO, E.R.; METTIFOGO, E.; REIS, A.C.F.; FREITAS, J.C.; NASCIMENTO, M.G.F. Isolamento de *Mycoplasma arginini* e *Actinomyces pyogenes* de ovino com pleuropneumonia. **Rev. Bras. Méd. Vet.**, v. 20, n. 3, p. 118-119, 1998.

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. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 45-46, 2002.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREUND, E.A.; ANDERSEN, H. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **Br. Vet. J.**, v. 142, n. 246, 1986.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2004. Disponível em: <http://www.oie.int>, acesso: out/2006.

PENHA, A.M. & D' APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v. 13, p. 299-301, 1942.

PÉPIN, M.; DUFOUR, P.; LAMBERT, M.; AUBERT, M.; VALOGNES, A.; ROTIS, T.; VAN de WIELE, A.; BERGONIER, D. Comparison of three enzyme-immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 281-285, 2003.

REAL, F.; DÉNIZ, S.; ACOSTA, B.; FERRER, O.; POVEDA, J.B. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. **Vet. Rec.**, v. 135, p. 15-16, 1994.

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R. ; FACCINI, J.L.H. ; NASCIMENTO, M .G. F. & LIGNON, G. B. Presença de micoplasma em exemplares de *Raillietia caprae* coletados do conduto auditivo externo de caprinos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 17, p. 122-124, 1995.

RODRIGUEZ F.; RAMIREZ, G.A.; RAMIREZ, A.S.; BALL, H.J.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; FERNANDEZ, A. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma agalactiae* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from naturally and experimentally infected goats. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.** v. 49, n. 5, p. 226-229, 2002.

ROSENGARTEN, R. & YOGEV, D. Variant colony surface antigenic phenotypes within *Mycoplasma* strain populations: Implications for species identification and strain standardization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 149-158, 1996.

RUFFIN, D.C. *Mycoplasma* infections in small ruminants. **Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.**, v. 17, n. 2, p. 315-332, 2001.

SANTOS, L.F.; CASTRO, R.S.; COSTA, E.O. “Califórnia mastitis test” e “Whiteside modificado” como critério de triagem para mastite caprina. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 30, n. 2, p. 295-298, 1995.

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Anal. Biochem.**, v.79, p. 544-552, 1977.

SINGH, V.P.; SRIVASTAVA, N.C.; KUMAR, M.; SUNDER, M.J.; VARSHNEY, J.P. Isolation and characterisation of an Indian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC from a case of caprine arthritis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 4, n. 27, p. 273-284, 2004.

SMITH, M.C. & SHERMAN, D.M. **Goat Medicine.** Philadelphia – USA: Lea & Febiger, 1994. 620 p.

STALHEIM, O.H.V. & STONE, S.S. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *Bovis* from arthritic cattle in Iowa and Nebraska. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 3, p. 169-172, 1976.

TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; AZEVEDO, E.O.; NASCIMENTO, E.R.; GONZALEZ, C.I.M.; RIET-CORREA, F. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats in Brazil. Clinic and pathological findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz Mycoplasmol. (IOM)**, XIV, Vienna, p. 49, 2002.

TOLA, S.; IDINI, G.; ROCCHIGIANI, A.M.; ROCCA, S.; MANUNTA, D.; LEORI G. A physical map of the *Mycoplasma agalactiae* strain PG2 genome. **Vet. Microbiol.**, v. 80, p. 121-130, 2001.

TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G. & LEORI G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v. 54, p. 17-22, 1997.

TULLY, J.G.; BARILE, M.F.; EDWARD, D.G.; THEODORE, T.S.; ERNO, H. Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 85, p. 102-120, 1974.

ZAVAGLI, V. L'agalaxie contagieuse des brebis et des chevres. **Bull. Off. Int. Epizoot.**, v. 36, p. 336-362, 1951.