

ANA CLAUDIA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO DE *Mycoplasma agalactiae* ISOLADOS NO
BRASIL E PRODUÇÃO DE VACINAS CONTRA AGALAXIA
CONTAGIOSA**

RECIFE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

ANA CLAUDIA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO DE *Mycoplasma agalactiae* ISOLADOS NO
BRASIL E PRODUÇÃO DE VACINAS CONTRA AGALAXIA
CONTAGIOSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro - UFRPE

Co-Orientador:

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo - UFCG

Recife

2012

Ficha catalográfica

C198c Campos, Ana Claudia
Caracterização de *Mycoplasma agalactiae* isolados no
Brasil e produção de vacinas contra agalaxia contagiosa /
Ana Claudia Campos. -- Recife, 2012.
75 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2012.
Referências.

1. Micoplasmose 2. Vacinação 3. Seqüenciamento
4. SDS-PAGE 5. *Western Blot* 6. Pequenos ruminantes
I. Castro, Roberto Soares de, orientador II. Título

CDD 636.089

Aos meus pais Inácio e Ligia,
Por toda a nossa história....

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos que contribuíram para realização deste trabalho e para o meu equilíbrio emocional, sem eles nada teria sido possível. Correndo o risco de omitir alguém:

Aos meus pais Inácio e Ligia, pelo amor, e por AINDA suportarem todo o meu mau humor, comportamento e ausência.

A minha querida irmã Andrea Carla, por tentar me ensinar que posso demonstrar meus sentimentos sem que isso me enfraqueça, e a Roberto por aceitar o “pacote” completo.

A minha família e amigos pelo apoio em todos os momentos dessa louca vida, e por mesmo sem entenderem, aceitaram minha ausência e chatice. Tia Solange, Tio Adair, Simara e Cecília esse agradecimento é para vocês!!!!

A Deus, por acreditar que vou ser uma pessoa melhor. Será que Ele ainda acredita?

Ao Prof. Roberto Castro, por todas as lições, oportunidades e confiança. Continuo sem saber se mereço tanto!

Mais uma vez a Oneide e Gabriel por dividirem o Prof. conosco. MUITÍSSIMO obrigada!!!!

Ao Prof. Edisio Oliveira de Azevedo, por todos os ensinamentos e orientações, pela paciência e por ter confiado a mim esse trabalho.

A Edisio por me mostrar que a gente pode ser profissional e pessoal ao mesmo tempo. Ainda tenho muito a aprender com você. “Temos coisas bonitas para contar...”

As crias de Edisio, Lucas e Camila, por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, pela ótima companhia e ensinamentos, e por aguentarem meu mau humor e chatices. Não sei o que faria sem a ajuda de vocês!!!!

Ao Srº Pedro Azevedo e a Srª Davina Oliveira pela multiplicação do bem em cada um de seus filhos.

A família Oliveira de Azevedo e Rocha de Azevedo pela acolhida e por me incluírem entre os seus.

A Belinha, por ser a criatura mais evoluída com quem convivi e por todos os nossos momentos. Espero realmente que a nossa amiga Patricia Brandão tenha razão.

A Antônia, Cuíca, Francisca e Tereza, pelo carinho, companhia e amor. Êita! E a Miguel pelas mordidas carinhosas. Anham!!!

Aos amigos de Edisio que hoje são meus também: Zanella; Elvira e Carlos; Auxiliadora e Aristarco; Patrícia, Jocelin, Aninha e Mariam; Verônica, Kleber, Rafael, Renata e Raissa; Graça, Clodoaldo e Arthur; Rosângela e Almir, Simone e Pedro, por todos os momentos de descontração. Vocês me mostram a cada contato o quanto os amigos são importantes em nossas vidas.

A minha “coleguinha” do inglês, Islânia, pelos momentos de pura descontração e de fiel amizade. Cada momento foi único!

A Aderaldo, que reforça a minha confiança que nessa Universidade ainda tem pessoas que realmente se importam com o TODO. Me faz um bem danado te encontrar na Rural!

A amiga Rosário Beltrão, que teve toda a paciência do mundo para me inicializar nas práticas laboratoriais. Obrigada pela amizade e pensamento sempre positivo.

Aos amigos, Andrea Barretto, Daniella Godoy, David Ferreira, Gustavo Frota, Cynara Parente, Kleber Germano, Andrei Loureiro, César Calzavara, Tânia Rios e Ana Carolina Medeiros, pelas ótimas lembranças.

A Sergio Alves, meu AMIGO, por toda a colaboração, lições e conversas!!!!

A Inês, pelas conversas descontraídas e apoio. O que seria de nós pobres desorientados, sem ela!

A menina Michele Moreira Martins de Oliveira, a quem sempre agradecerei. Você me ensinou taaaanto!!!!

Ao casal Dalva e a Aderaldo Alcântara por toda a trabalhadeira que dei e continuo dando a eles, e por me fazerem acreditar que tudo daria certo.

A Marcia Almeida, por todas as orientações técnicas neste trabalho, e olha que foram muitas, e por ter me incluído em sua convivência familiar.

A Gedeão, Zé Peão e Oscar, assentados da reforma agrária e criadores de cabras leiteiras em Patos/PB, por toda a colaboração em nosso trabalho. Vocês fizeram esse trabalho acontecer, e me reforçam a cada dia que o caminho do desenvolvimento desse país está na mão dos agricultores familiares. Muito obrigada!

A família de Gedeão e Zé Peão, das Neves, Ana Júlia, Geovana, Ilana, Junior e Cassio pela convivência e acolhida.

A Xaguinha pelas milhares de carroças de água para as ovelhas e carneiros e pela especial atenção e cuidado com os mesmos.

Ao Sr. Cuité - o que seria dos animais e dos experimentos da Veterinária da UFCG sem a ajuda preciosa desse trabalhador? Muito obrigada pela lida com os nossos animais.

As meninas e aos meninos do Laboratório de Vacinas e Diagnóstico da Universidade Federal de Campina Grande - Campus de Patos, Dalva Alcântara, Adriana Cunha, Raizza Barros, Daniel Assis, Aline Antas, Aline Mamede e Dêvede Silva pelo trabalho em conjunto nessa tese.

Aos colegas da Medicina Veterinária e do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da UFCG - Patos, Hyago Ramalho, Nerivaldo Wanderley, Aldenir Cavalcanti, Tereza Rotondano, Expedito Camboim e Diego Barreto por todo o apoio durante o experimento.

A todo apoio que recebemos dos alunos de graduação da Medicina Veterinária da UFCG- Patos, entre os quais cito: Gizele, Mario, Arlison, Dayvid, Valbério, Arthur, Leonardo Barros, Pedro, Diego Vagner, Herbis Eduardo, Hélio, Thiago, Raissa, Vinícios, Marília e Nozaí.

Ao Prof. Carlos Peña UFCG-Patos, pela preciosa orientação, tempo disponibilizado e frases de estímulo e confiança nesse projeto.

Ao Prof. Antônio Flavio, UFCG-Patos, pela contribuição no diagnóstico gestacional dos animais.

Ao Prof. Eldinê Miranda e a Profa. Sara Vilar HV, UFCG-Patos, pela atenção médica aos nossos animais.

A Ana Lisa pela especial atenção as nossas análises.

A Profa Rita Maia pela colaboração e sugestões para esse trabalho, mesmo tão perto do nascimento de sua segunda princesinha.

A Dra Josi Veschi pela colaboração na avaliação do nosso trabalho.

Ao Prof. Elmiro Nascimento pelas contribuições técnicas e disponibilidade em contribuir com as nossas pesquisas.

Aos meus professores da Cultura Inglesa- Patos: Sacha Medcraft, Olaf Bakke, Eripetson Lucena e Deborah Medcraft por entenderem minhas limitações e me estimularem a continuar.

Aos mestres de toda uma vida escolar e acadêmica que compartilharam seus conhecimentos comigo. Muito obrigada por tudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A Tom Menezes, pela atenção ímpar e por todo profissionalismo que nos faz andar na linha nesse programa.

A Tereza e Lana Claudia que passaram um aperto danado nesse período de defesas. Vocês deram conta direitinho!!!!

A Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, pelo apoio oferecido durante o experimento.

Ao Laboratório Vencofarma pela disponibilização dos adjuvantes.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA pelo financiamento dessa pesquisa através do Edital CNPq/MAPA/SDA 064/2008.

Aos caprinos e ovinos, que doaram suas vidas involuntariamente para a execução desse trabalho. Que os resultados beneficiem e aumentem a qualidade de vida de caprinos e ovinos do nosso Nordeste.

“Setembro passou/ Outubro e Novembro/ Já tamo em Dezembro/ Meu Deus, que é de nós,/ Meu Deus, meu Deus/ Assim fala o pobre/ Do seco Nordeste/ Com medo da peste/ Da fome feroz// A treze do mês/ Ele fez experiência/ Perdeu sua crença/ Nas pedras de sal,/ Meu Deus, meu Deus/ Mas noutra esperança/ Com gosto se agarra/ Pensando na barra/ Do alegre Natal// Rompeu-se o Natal/ Porém barra não veio/ O sol bem vermeio/ Nasceu muito além/ Meu Deus, meu Deus/ Na copa da mata/ Buzina a cigarra/ Ninguém vê a barra/ Pois a barra não tem// Sem chuva na terra/ Descamba Janeiro,/ Depois fevereiro/ E o mesmo verão/ Meu Deus, meu Deus/ Entonce o nortista/ Pensando consigo/ Diz: "isso é castigo/ não chove mais não"// Apela pra Março/ Que é o mês preferido/ Do santo querido/ Senhor São José/ Meu Deus, meu Deus/ Mas nada de chuva/ Tá tudo sem jeito/ Lhe foge do peito/ O resto da fé// Agora pensando/ Ele segue outra tria/ Chamando a fãmia/ Começa a dizer/ Meu Deus, meu Deus/ Eu vendo meu burro/ Meu jegue e o cavalo/ Nós vamos a São Paulo/ Viver ou morrer// Nós vamos a São Paulo/ Que a coisa tá feia/ Por terras alheia/ Nós vamos vagar/ Meu Deus, meu Deus/ Se o nosso destino/ Não for tão mesquinho/ Cá e pro mesmo cantinho/ Nós torna a voltar// E vende seu burro/ Jumento e o cavalo/ Inté mesmo o galo/ Venderam também/ Meu Deus, meu Deus/ Pois logo aparece/ Feliz fazendeiro/ Por pouco dinheiro/ Lhe compra o que tem// Em um caminhão/ Ele joga a fãmia/ Chegou o triste dia/ Já vai viajar/ Meu Deus, meu Deus/ A seca terrível/ Que tudo devora/ Lhe bota pra fora/ Da terra natá// O carro já corre/ No topo da serra/ Oiando pra terra/ Seu berço, seu lar/ Meu Deus, meu Deus/ Aquele nortista/ Partido de pena/ De longe acena/ Adeus meu lugar// No dia seguinte/ Já tudo enfadado/ E o carro embalado/ Veloz a correr/ Meu Deus, meu Deus/ Tão triste, coitado/ Falando saudoso/ Seu filho choroso/ Exclama a dizer// De pena e saudade/ Papai sei que morro/ Meu pobre cachorro/ Quem dá de comer?/ Meu Deus, meu Deus/ Já outro pergunta/ Mãezinha, e meu gato?/ Com fome, sem trato/ Mimi vai morrer// E a linda pequena/ Tremendo de medo/ "Mamãe, meus brinquedo/ Meu pé de fulô?"/ Meu Deus, meu Deus/ Meu pé de roseira/ Coitado, ele seca/ E minha boneca/ Também lá ficou// E assim vão deixando/ Com choro e gemido/ Do berço querido/ Céu lindo azul/ Meu Deus, meu Deus/ O pai, pesaroso/ Nos filho pensando/ E o carro rodando/ Na estrada do Sul// Chegaram em São Paulo/ Sem cobre quebrado/ E o pobre acanhado/ Procura um patrão/ Meu Deus, meu Deus/ Só vê cara estranha/ De estranha gente/ Tudo é diferente/ Do caro torrão// Trabaia dois ano,/ Três ano e mais ano/ E sempre nos prano/ De um dia vortar/ Meu Deus, meu Deus/ Mas nunca ele pode/ Só vive devendo/ E assim vai sofrendo/ É sofrer sem parar// Se alguma notícia/ Das banda do norte/ Tem ele por sorte/ O gosto de ouvir/ Meu Deus, meu Deus/ Lhe bate no peito/ Saudade lhe molho/ E as água nos óio/ Começa a cair// Do mundo afastado/ Ali vive preso/ Sofrendo desprezo/ Devendo ao patrão/ Meu Deus, meu Deus/ O tempo rolando/ Vai dia e vem dia/ E aquela fãmia/ Não vorta mais não// Distante da terra/ Tão seca mas boa/ Exposto à garoa/ À lama e o pau/ Meu Deus, meu Deus/ Faz pena o nortista/ Tão forte, tão bravo/ Viver como escravo/ No Norte e no Sul/ Ai, ai ai..."

Patativa do Assaré - A triste Partida

“Que o retorno seja uma grande opção!”

RESUMO

Mycoplasma agalactiae é o principal microrganismo causador da agalaxia contagiosa (AC), doença caracterizada por mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. Em 2001, *M. agalactiae* foi isolado e identificado no Brasil, determinando grandes prejuízos econômicos. Considerando a necessidade de caracterização de amostras brasileiras de *M. agalactiae* e da implantação de medidas eficazes de controle, esse trabalho foi realizado em três etapas. O primeiro artigo descreve o perfil bioquímico e protéico de isolados de *M. agalactiae* de pequenos ruminantes através do cultivo em meio Hayflick modificado, testes bioquímicos e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a imunogenicidade destas proteínas por *Western Blot* (WB). As amostras apresentaram similaridade no perfil protéico com bandas variando de 30 a 135 kDa no SDS-PAGE, além da presença de uma proteína imunodominante de 48 kDa no WB. Para dar continuidade a identificação do agente envolvido na AC no Brasil, o segundo artigo descreve a análise de dez sequências de *M. agalactiae* isolados de caprinos e ovinos. Um fragmento de DNA de 360 bp do gene 16S rRNA amplificado por PCR foi sequenciado. A análise revelou alto grau de similaridade, entre as dez sequências e uma similaridade maior que 99% com amostras de referência de *M. agalactiae*. No terceiro artigo, a eficiência de três vacinas inativadas, preparadas com amostra local de *M. agalactiae* e adsorvidas com três adjuvantes, foi avaliada em caprinos e ovinos. A resposta sorológica dos animais vacinados foi analisada através de um ELISA indireto. As três vacinas induziram produção de anticorpos, podendo ser utilizadas como uma alternativa para reduzir as perdas econômicas e prevenir a agalaxia contagiosa. Estes resultados confirmam a presença e disseminação do *M. agalactiae* no país e fortalece a possibilidade de controle da doença pela adoção da vacinação dos rebanhos.

Palavras-chave: caprina, ovina, micoplasmose, vacinação, sequenciamento, SDS-PAGE, *Western Blot*

ABSTRACT

Mycoplasma agalactiae is the main causative organism of contagious agalactia (CA), a disease characterized by mastitis followed by agalactia, polyarthritis, and keratoconjunctivitis. In 2001, *M. agalactiae* was isolated and identified in Brazil, causing great economic losses. Considering the need for characterization of Brazilian strains of *M. agalactiae* and implementation of effective control, this work was performed in three steps. The first article describes the biochemical and protein profile of isolates of *M. agalactiae* in small ruminants through the culture in modified Hayflick medium, biochemical tests, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunogenicity of these proteins by Western blot (WB). The samples had similar protein in the profile bands ranging from 30-135 kDa in SDS-PAGE, in addition the presence of a protein of 48 kDa immunodominant WB was shown. To continue identifying the agent involved in the AC in Brazil, the second article describes the analysis of ten sequences of *M. agalactiae* isolated from goats and sheeps. A DNA fragment of 360 bp of the 16S rRNA gene was amplified by PCR and sequenced. The analysis revealed a high degree of similarity among all the sequences. The study revealed greater than 99% similarity with the reference samples of *M. agalactiae*. In the third article, efficacy of three inactivated vaccines prepared with a local of *M. agalactiae* sample and adsorbed with three adjuvants was evaluated in goats and sheep. The antibody response in vaccinated animals was analyzed using an indirect ELISA. The three vaccines induced antibody production, and can be an alternative to reduce economic losses and prevent contagious agalactia. These results confirms the presence and spread of *M. agalactiae* in the country and enhances the possibility of controlling the disease through the adoption of livestock vaccination.

Keywords: goat, sheep, mycoplasmosis, vaccination, sequencing, SDS-PAGE, Western Blot

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
ARTIGO CIENTÍFICO 1	
Figura 1	Características dos isolados de <i>M. agalactiae</i> em meio Hayflick sólido. A: Colônias com aspecto de “ovo frito”. B: Presença de colônias e Filmes. 44
Figura 2	PCR para o gene 16S rRNA dos isolados de <i>M. agalactiae</i> . PM: Peso Molecular. CN: Controle Negativo. Linhas 3 a 10: identificação das amostras analisadas. 44
Figura 3	Perfil protéico de <i>M. agalactiae</i> obtido por SDS-PAGE e corado com Coomassie Blue R-250. Linhas 2 a 9: identificação das amostras analisadas. O peso molecular está em kDa. A direita proteínas de <i>M. agalactiae</i> . 45
Figura 4	Resultado do <i>dot-blot</i> utilizando soros positivos e negativos diluídos de 1/10 até 1/200, antígeno total e diluído 1/2 até 1/32 e conjugado anti-cabra peroxidase 1/100. TL = tampão de lise. 45
Figura 5	Resultado do <i>dot-blot</i> utilizando soros positivos e negativos diluídos de 1/10 até 1/200, antígeno total e diluído 1/2 até 1/32 e conjugado anti-cabra peroxidase 1/200. TL = tampão de lise. 46
Figura 6	Perfil imunogênico de <i>M. agalactiae</i> através de WB utilizando <i>pool</i> de soros positivos (CP). BrPB3.03 amostra proveniente da Paraíba e BrRN1.01 do Rio Grande do Norte. O peso molecular está em kDa. A direita proteínas de <i>M. agalactiae</i> . 47
ARTIGO CIENTÍFICO 2	
Figura 1	Árvore montada pelo programa MEGA5 após alinhamento da sequência consenso do gene 16S rRNA dos isolados com sequências de <i>M. agalactiae</i> e <i>M. bovis</i> disponíveis no GenBank. O alinhamento foi realizado pela ferramenta ClustalW e agrupamento pelo método de neighbor-joining. O gene 16S rRNA da espécie <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> (gi 359801421) foi usado como outgroup. 55

ARTIGO CIENTÍFICO 3

- Figura 1** Níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* analisados pelo ELISA-Gs em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. Gc1 = caprinos imunizados com a vacina 1; Gc2 = caprinos imunizados com a vacina 2; Gc3 = caprinos imunizados com a vacina 3; Gc4 = caprinos não imunizados (controle). 65
- 0 = dia da 1ª dose; 15 = 15 dias após 1ª dose; 21 = dia da 2ª vacinação, 21 dias após 1ª dose; 51 a 171 = dias após a 1ª dose.
- Figura 2** Níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* analisados pelo ELISA-Gs em ovinos vacinados contra agalaxia contagiosa. Gov1 = ovinos imunizados com a vacina 1; Gov2 = ovinos imunizados com a vacina 2; Gov3 = ovinos imunizados com a vacina 3; Gov4 = ovinos não imunizados (controle). 65
- 0 = dia da 1ª dose; 15 = 15 dias após 1ª dose; 21 = dia da 2ª vacinação (21 dias após 1ª dose); 51 a 171 = dias após a 1ª dose.
- Figura 3** Comparação da resposta imune através do ELISA-Gs dos grupos de caprinos desafiados. Gc1 = caprinos imunizados com a vacina 1; Gc2 = caprinos imunizados com a vacina 2; Gc3 = caprinos imunizados com a vacina 3; Gc4 = caprinos não imunizados (controle). 69
- D0= dia do desafio (75 dias após a segunda dose da vacina); D1 a D8 = data das coletas (em dias) após o desafio, realizadas com intervalo de 7 dias.
- Figura 4** Comparação da resposta imune através do ELISA-Gs dos grupos de ovinos desafiados. Gov1 = ovinos imunizados com a vacina 1; Gov2 = ovinos imunizados com a vacina 2; Gov3 = ovinos imunizados com a vacina 3; Gov4 = ovinos não imunizados (controle). 69
- D0= dia do desafio (75 dias após a segunda dose da vacina); D1 a D8 = datas das coletas (em dias) após o desafio, realizadas com intervalo de 7 dias.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
ARTIGO CIENTÍFICO 1	
Tabela 1 Lista de isolados brasileiros de <i>Mycoplasma agalactiae</i> analisados.	40
ARTIGO CIENTÍFICO 3	
Tabela 1 Tamanho da reação local (em mm) e persistência do nódulo (em dias) no local de inoculação de acordo com a vacina utilizada em caprinos (Gc) e ovinos (Gov).	64
Tabela 2 Percentual de densidade óptica (DO) analisado através do ELISA-Gs dos caprinos vacinados (Gc1, Gc2, Gc3) e não vacinados (Gc4).	66
Tabela 3 Percentual de densidade óptica (% DO) analisado através do ELISA-Gs dos ovinos vacinados (Gov1, Gov2, Gov3) e não vacinados (Gov4).	67
Tabela 4 Resultados do ELISA-Gs em percentual de densidade óptica (% DO) após desafio dos caprinos. Grupos vacinados (Gc1, Gc2, Gc3) e não vacinado (Gc4).	70
Tabela 5 Resultados do ELISA-Gs em percentual de densidade óptica (% DO) após desafio dos ovinos. Grupos vacinados (Gov1, Gov2, Gov3) e não vacinado (Gov4).	70

SUMÁRIO

	Pág.
Introdução	16
2 Objetivos	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 Revisão de Literatura	19
3.1 Agalaxia Contagiosa	19
3.2 Identificação e caracterização do <i>Mycoplasma agalactiae</i>	21
3.3 Medidas de controle e prevenção	23
3.4 Situação no Brasil	27
Referências Bibliográficas	30
4 Artigo Científico 1	37
Caracterização bioquímica e protéica de <i>Mycoplasma agalactiae</i> do Brasil.	
5 Artigo Científico 2	52
Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA confirma homogeneidade de <i>Mycoplasma agalactiae</i> no Brasil.	
6 Artigo Científico 3	57
Desenvolvimento e avaliação da eficácia de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa no Brasil.	

Introdução

O desenvolvimento da ovinocaprinocultura na região Nordeste do Brasil tem recebido constantes incentivos do setor público nos últimos anos, tanto em termos de destinação de recursos para financiamento como por meio de políticas de compra direta do leite, carne e derivados. A crescente oferta de matéria-prima desencadeou a instalação de usinas de processamento e matadouros, constituindo-se numa das alternativas para o beneficiamento do leite e da carne, facilitando a comercialização do produto, inclusive dos agricultores familiares.

Em que pese o bom momento do setor, alguns entraves no processo produtivo podem ser observados. Falta assistência técnica qualificada, o manejo alimentar é precário, o armazenamento de forragens é insuficiente, o processo de organização dos produtores e da produção é incipiente e os cuidados higiênico-sanitários dos rebanhos continuam sendo negligenciados. A circulação de animais entre os rebanhos se dá de forma indiscriminada e sem controle do serviço de defesa sanitária animal.

Do ponto de vista sanitário, uma das principais preocupações atuais têm sido a ocorrência e disseminação da Agalaxia Contagiosa (AC) em ovinos e caprinos causada por *Mycoplasma agalactiae*. A doença se caracteriza por mastite, agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite causando sérios prejuízos aos caprinocultores da região desde 2001, quando pesquisadores da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Empresa de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA e Universidade Federal Fluminense – UFF fizeram o diagnóstico clínico-patológico e microbiológico da enfermidade em um rebanho leiteiro pertencente à Estação Experimental de Pendência, do governo do estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2002; TABOSA et al., 2002).

Por tratar-se de uma doença até então exótica no país, e não haver, naquele momento, métodos diagnósticos rápidos, a infecção rapidamente se disseminou entre os rebanhos dos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, favorecida pela intensa comercialização de animais entre estes Estados (AZEVEDO et al., 2006).

No início dos primeiros casos no estado da Paraíba, o sacrifício dos animais dos rebanhos acometidos foi indicado. Entretanto, muitos criadores não conheciam a doença e comercializaram seus animais, disseminando a infecção e impossibilitando seu controle.

Diferentes medidas podem ser adotadas para o controle da doença, sendo que nenhuma delas isolada é suficiente para manter os rebanhos totalmente protegidos da infecção. Portanto, a associação de diferentes procedimentos é a melhor estratégia. A administração de antibióticos por longos períodos reduz a apresentação dos casos clínicos, em contrapartida, mantém um grande número de animais portadores que transmitem a bactéria para outros animais.

A indução de partos com separação imediata das crias pode auxiliar a formação de rebanhos livres da bactéria, mesmo quando nascidos de animais infectados, e a vacinação dos animais jovens contribui para redução do número de casos clínicos e tem sido amplamente adotada em regiões endêmicas. Diversos estudos que demonstram a eficiência das vacinas contra *Mycoplasma agalactiae* têm sido realizados na Europa.

No Brasil, apesar da doença ter sido notificada há 10 anos, não há vacinas disponíveis para comercialização.

A preparação de vacinas requer o conhecimento do microrganismo causador, em particular sua constituição antigênica. Para tanto, diversas técnicas podem ser empregadas, sendo que a SDS-PAGE é a mais comumente utilizada. Por outro lado, a qualidade de uma vacina está diretamente relacionada com o processo de produção do antígeno ou sua inativação, bem como os adjuvantes empregados na formulação.

Neste sentido, este trabalho está dividido em três artigos. No primeiro artigo, é feita a caracterização protéica e imunogênica de isolados de *M. agalactiae* utilizando SDS-PAGE e *Western Blot*. No segundo artigo, são apresentados os resultados da utilização de vacinas inativadas adsorvidas com diferentes adjuvantes na indução de anticorpos em caprinos e em ovinos e, no terceiro artigo, é apresentado o sequenciamento de um fragmento de DNA do gene 16S rRNA amplificado por PCR e a análise filogenética destes isolados, comparando-os às sequências depositadas no GenBank. Desta forma, este trabalho teve como objetivo dar continuidade ao entendimento da epidemiologia da agalaxia contagiosa no Brasil e disponibilizar uma alternativa para a redução de casos da doença.

2 Objetivos

2.1 Geral

Caracterizar *Mycoplasma agalactiae* isolados no Brasil e produzir uma vacina para o controle da Agalaxia Contagiosa utilizando amostra brasileira de *M. agalactiae*.

2.2 Específicos

2.2.1 Caracterizar amostras brasileiras de *M. agalactiae*, através da análise do perfil protéico e bioquímico.

2.2.2 Sequenciar fragmento de DNA do gene 16S rRNA de isolados brasileiros de *M. agalactiae*.

2.2.3 Testar a imunogenicidade das vacinas produzidas através da avaliação dos níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* dos animais vacinados utilizando um ELISA indireto.

2.2.4 Avaliar a eficácia das vacinas através do desafio de animais vacinados.

3 Revisão de Literatura

3.1 Agalaxia Contagiosa

A agalaxia contagiosa (AC) causada por *Mycoplasma agalactiae* tem sido relatada em caprinos e ovinos de forma endêmica em países da Europa, África e região central e oeste da Ásia e como uma doença emergente em países do continente americano e no Japão (DOUTRE et al., 1981; REAL et al., 1994; EGWU et al., 2001; GIL et al., 2003; AZEVEDO et al., 2006; OIE, 2011). Outras espécies podem estar envolvidas, como *M. capricolum* subesp. *capricolum*, *M. mycoides* subesp. *mycoides* LC (Large Colony), *M. putrefaciens* e *M. arginini* (CORRALES et al., 2007).

Os sinais clínicos característicos são mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. A infecção dissemina-se rapidamente no rebanho, podendo atingir 30-85% dos animais em curto intervalo de tempo determinando perdas consideráveis, sobretudo pela redução acentuada na produção de leite e morte dos animais (DOUTRE et al., 1981; REAL et al., 1994; EGWU et al., 2001; GIL et al., 2003).

M. agalactiae infecta o hospedeiro principalmente por via oral e intramamária, e, menos frequentemente, respiratória, subcutânea, genital e ocular. Uma vez ocorrida a infecção, os microrganismos aderem-se ao tecido epitelial, utilizando adesinas localizadas na superfície (RAZIN, 1999). Em seguida os animais desenvolvem bacteremia com febre e distribuição do agente nos órgãos alvos, (glândula mamária, olhos, órgãos internos, linfonodos, articulações, tendões, etc), onde ocorre o processo inflamatório.

A enfermidade é transmitida rapidamente através do contato com animais infectados, com ou sem sinais clínicos, ou através da ingestão de água e alimentos contaminados com exsudatos e leite. As fêmeas em lactação adquirem a infecção através das mãos do ordenhador, ordenhadeira mecânica através do contato com materiais contaminados, ou por inalação. A venda de animais portadores e o contato entre os animais durante a transferência constituem os principais meios de transmissão entre rebanhos. Nos rebanhos de áreas endêmicas a doença

frequentemente ocorre próximo ou durante a lactação, por vários anos seguidos (BERGONIER et al., 1997; MADANAT et al., 2001).

A doença persiste no rebanho, em virtude do agente ser excretado por longos períodos quando já não há sinais clínicos. O isolamento de *M. agalactiae* foi possível a partir do leite de cabras por um período de 12 meses, podendo persistir por até oito anos (MADANAT et al., 2001). A presença de portadores assintomáticos em um rebanho representa um sério risco à manutenção da infecção. Outra condição de risco de transmissão é a presença de *M. agalactiae* no conduto auditivo externo (DaMASSA, 1983; RIBEIRO et al., 1997), local onde pode evitar a ação da resposta imunológica do hospedeiro.

A morbidade pode alcançar 100% e a mortalidade pode atingir 10-80% (AZEVEDO et al., 2002; NICHOLAS, 2002), dependendo do perfil imunológico do rebanho. Vários surtos importantes têm sido descritos, e medidas radicais, às vezes são indicadas, na perspectiva de controlar/erradicar a infecção (AZEVEDO, 2005). Em países onde cabras e ovelhas desempenham um importante papel como alimento e mercadoria, a agalaxia contagiosa é um dos mais sérios problemas sanitários (DaMASSA, 1992; MADANAT et al., 2001; MARENDA et al., 2004).

Os casos clínicos ocorrem com maior freqüência no início da lactação e quando as condições higiênicas dos estábulos, salas de ordenhas e ordenhadores não são satisfatórias (KINDE et al., 1994). O período de incubação da AC varia de uma a oito semanas, dependendo da quantidade de microrganismos, virulência da amostra e resistência do hospedeiro. Normalmente, 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 apresentar aspecto purulento. Quando deixado em repouso, os grumos se depositam no fundo do recipiente. 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). Na fase clínica da agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes há aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite (CORRALES et al., 2004).

Não há predisposição por idade e o quadro de poliartrite é mais comum nas articulações do carpo e tarso, que apresentam-se doloridas, com líquido de aspecto fibrino-purulento, podendo variar de transparente a amarelado (DaMASSA et al., 1984). A poliartrite causa perda de peso acentuada, podendo levar o animal à morte

por inanição, devido à incapacidade de locomoção (AZEVEDO, 2005). Nos casos crônicos os animais podem desenvolver anquilose, podendo o animal ficar sem disposição e evitando ficar em estação (DaMASSA et al., 1992; MADANAT et al., 2001).

Os sintomas oculares variam de conjuntivite, ceratite a severa ceratoconjuntivite. Quando isto ocorre há lacrimejamento, fotofobia, congestão da mucosa conjuntiva e, nos casos avançados, vascularização da superfície da córnea, podendo ocorrer perda da visão uni ou bilateral (CORRALES et al., 2007).

3.2 Identificação e caracterização do *Mycoplasma agalactiae*

Os métodos de diagnóstico utilizados para identificação de micoplasmas estão bastante desenvolvidos. O aparecimento de colônias com aspecto de “ovo frito” ou mamilar e a presença de filmes e manchas associados ao perfil bioquímico, como não degradar arginina nem fermentar glicose, são úteis para identificação de *M. agalactiae*, sendo, portanto, o método padrão para diagnóstico laboratorial. Os meios mais utilizados são seletivos (PPLO e Hayflick caldo e agar) contendo penicilina e acetato de tálio e enriquecidos com soro equino ou suíno, que suprem a necessidade de colesterol dos micoplasmas, são os mais utilizados.

A diferenciação das espécies através de técnicas sorológicas é rotineiramente utilizada, no entanto, em alguns casos, há necessidade de comprovação por técnicas mais específicas, em virtude de reações cruzadas entre amostras estreitamente relacionadas ou mesmo por variações no tamanho e expressão antigênica das proteínas de superfície da amostra (ROSENGARTEN & YOGEV, 1996).

Estruturalmente, a membrana celular dos micoplasmas é constituída por 2/3 de proteínas e 1/3 de lipídeos. As lipoproteínas de membrana são mais abundantes nesse grupo que nas demais bactérias e constituem a maioria dos antígenos de superfície dos micoplasmas. Sistemas baseados em mutação são freqüentemente desenvolvidos como estratégia de sobrevivência dos micoplasmas no interior dos hospedeiros (RAZIN et al., 1998).

Diferentes proteínas estão associadas com a aderência do micoplasma às células hospedeiras. Uma proteína de 40 kDa, associada à aderência de *M. agalactiae*, foi identificada por Fleury et al. (2002) que confirmaram sua participação

como mediadora desse evento, pois anticorpos anti-P40 inibiram significativamente a aderência *in vitro* de *M. agalactiae* às células sinoviais de ovinos. A P40 é específica de *M. agalactiae*, pois espécies de *Mycoplasma* estreitamente relacionadas não apresentaram resposta quando analisadas por southern blotting. Soro monoclonal anti-P40 produzido em coelho reagiu com uma proteína com peso molecular de 37 kDa da amostra de referência PG2 e de outras 22 amostras de *M. agalactiae* isoladas em diferentes países da Europa (FLEURY et al., 2002).

Tola et al. (2001) caracterizaram e seqüenciaram 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.

Estudos conduzidos por Fleury et al. (2001) revelaram uma proteína com 30 kDa associada à membrana de *M. agalactiae*. Das 27 amostras pesquisadas, 20 apresentaram P30. A P30 induziu uma resposta imune que permaneceu crescente até 21 e 61 dias quando analisadas por ELISA e *Imunoblotting*, respectivamente.

Santona et al. (2002) identificaram epítomos imunodominantes de uma lipoproteína de *M. agalactiae* e sugeriram que esses sítios podem ser utilizados como vacinas sintéticas contra agalaxia contagiosa. Proteínas com 40, 55, 70, 80 e 110 kDa foram detectadas em amostras isoladas de ovinos com AC, destacando-se uma de 55 kDa que foi imunodominante quando testada com os 96 soros de ovinos infectados. Esta proteína parece ser menos representativa na amostra de referência PG2.

Chávez-González et al. (1995) desenvolveram dois PCR's baseados na seqüência do gene 16S rRNA de *M. agalactiae* e *M. bovis*. Os *primers* iniciadores foram idênticos nos dois sistemas e complementares para a região variável V2, enquanto os *primers* reversos tinham dois nucleotídeos diferentes, complementares para a região variável V6. O resultado de ambos os sistemas foi um produto amplificado com 360 pb.

Mattsson et al. (1991) analisaram a seqüência parcial do gene 16S rRNA de *M. agalactiae* e *M. bovis* e constataram, pela utilização de sondas de hibridação, que não houve hibridação entre as amostras de bovinos, caprinos e ovinos para a seqüência da região V8, podendo ser usada para detectar *M. agalactiae* em amostras de caprinos e ovinos.

O grau de variabilidade intra-específica do gene 16S rRNA de *M. agalactiae* e *M. bovis* isoladas na Europa foi investigado por Königsson et al. (2002) utilizando o seqüenciamento do produto amplificado por PCR. O número de nucleotídeos diferentes em isolados de *M. agalactiae* variou de 0 a 14 e de 0 a 10 em *M. bovis*, enquanto que o número de polimorfismos variou de 0 a 7 e de 0 a 6, respectivamente. Das 17 amostras de *M. agalactiae*, nove posições polimórficas foram identificadas, enquanto que *M. bovis* apresentou seis posições em oito amostras estudadas. Os autores confirmaram a estreita relação entre as duas espécies, embora tenham detectado 14 nucleotídeos diferentes nas seqüências do gene 16S rRNA, mas 10 deles estão localizados em posições polimórficas, ou seja, a diferença entre as duas amostras envolvendo o gene 16S rRNA é de apenas quatro nucleotídeos.

3.3 Diagnóstico, prevenção e controle

Para o estabelecimento de estratégias de controle e classificação de um rebanho em relação a AC é necessário a implantação de uma rotina de avaliações, como a realização de exame bacteriológico do leite para isolamento do *M. agalactiae*, exames clínicos, análise epidemiológica, além de acompanhamento sorológico semestral ou anual para fins de monitoramento (PÉPIN et al., 2003).

O diagnóstico presuntivo da AC é estabelecido com base nos achados epidemiológicos e na presença de sinais clínicos. Entretanto, se somente um sinal da doença está presente, torna-se mais difícil o diagnóstico clínico, devendo ser confirmado através de exames laboratoriais.

O isolamento e identificação do agente infeccioso é realizado através do cultivo em meios específicos, contendo soro equídeo ou suíno, como fonte de colesterol. Diversas amostras clínicas podem ser utilizadas, porém o leite tem apresentado melhores resultados. Suabe ocular, nasal, vaginal, líquido articular, sangue, urina, lavado do conduto auditivo externo, entre outros, também podem ser cultivados (MADANAT et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006).

Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas têm sido padronizadas na perspectiva de reduzir o período necessário para o diagnóstico final. A crescente utilização da biologia molecular, como ferramenta diagnóstica, tem permitido a identificação de antígenos de superfície, segmentos do DNA cromossomal ou RNA

ribossomal (rRNA), com alta sensibilidade e especificidade, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) a técnica mais comumente empregada (CHAVEZ-GONZALEZ et al., 1995; TOLA et al., 1996; GRECO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006;). No entanto, estas técnicas são de difícil aplicação na rotina laboratorial por exigir reagentes de alto custo, equipamentos sofisticados e mão-de-obra qualificada.

O diagnóstico também pode ser feito mediante a utilização de técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos, como *Western Blot* (DE LA FE et al., 2007), teste de fixação de complemento (KITTELBERGER et al., 2006) e os ensaios imunoenzimáticos (LAMBERT et al., 1998; MADANAT et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006).

Uma das primeiras providências para o controle de surtos de agalaxia contagiosa é o isolamento dos animais infectados e a rápida administração de antibióticos com intuito de reduzir a carga infectante. Muitos agentes antimicrobianos, tais como macrolídeos e lincosamídeos, tetraciclina, tiamulin e fluoroquinolonas, são eficazes contra os micoplasmas, embora já se tenha relatos de resistência aos antibióticos mais constantemente utilizados (LORIA et al., 2002; ASSUNÇÃO et al., 2006; ANTUNES et al., 2008).

Embora haja a possibilidade de combater esta infecção com o uso de antibióticos, a administração por períodos curtos (cinco a sete dias), com redução ou desaparecimento dos sinais clínicos, não elimina totalmente a bactéria, propiciando que os animais tornem-se permanentemente infectados. Por outro lado, o alto custo com tratamentos prolongados faz com que os criadores abandonem o tratamento e comercializem os animais assim que os sintomas desaparecem, favorecendo ainda mais a disseminação da infecção.

Quando a infecção entra em um território livre da agalaxia contagiosa, a medida mais efetiva parece ser o sacrifício dos animais. Entretanto, por causa do impacto econômico e social desta intervenção, torna-se difícil sua aplicação, particularmente em países com baixo desenvolvimento econômico (MADANAT et al., 2001; AZEVEDO, 2005; CORRALES et al., 2007).

A busca de alternativas para controlar a doença tem sido constante. Uma das possibilidades é a separação das crias no momento do parto com oferecimento de colostro e leite tratado termicamente ou de animais negativos (ALCÂNTARA et al., 2003).

Em áreas endêmicas, o controle objetiva reduzir a disseminação da infecção intra e inter-rebanhos pela redução da movimentação de animais, higienização das instalações, antibioticoterapia e vacinação (BERGONIER et al., 1997). Desde a década de 1970, a Europa tem adotado a vacinação como medida profilática para AC em ovinos e caprinos utilizando vacinas vivas atenuadas (FOGGIE et al., 1970; 1971). No entanto, é a partir da década de 1990 que esta prática foi mais intensamente empregada com diferentes formulações. A maioria das vacinas é preparada apenas com *M. agalactiae*, mas outras são formuladas a partir da associação de *M. agalactiae* com *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Large Colony), *M. putrefaciens*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* (LEÓN VIZCAÍNO et al., 1995; TOLA et al., 1999; GRECO et al., 2002; DE LA FE et al., 2007; BUONAVOGLIA et al., 2008; BUONAVOGLIA et al., 2010).

Vacinações são consideradas apropriadas particularmente em regiões de baixo poder econômico e social. Nestes locais a imunização é desejável, até porque medidas mais radicais (sacrifício de animais, restrição de comércio e trânsito de pessoas e animais) são praticamente impossíveis de serem adotadas.

Entre as vacinas desenvolvidas poucas modificações foram realizadas nos protocolos utilizados. Vacinas vivas atenuadas contra *M. agalactiae* induzem títulos mais altos e mais duradouros, mas o microrganismo pode ser eliminado no leite por vários meses (MADANAT et al., 2001). Esses inconvenientes fazem com que muitos países não autorizem o uso de vacinação contra agalaxia contagiosa. Por outro lado, vacinas inativadas estimulam títulos mais baixos e menos persistentes, e devem ser repetidas em períodos mais curtos, de preferência antes e após o parto (LEON VIZCAINO et al., 1995), sendo consideradas uma alternativa mais segura de controle da AC.

Na maioria das vezes, as vacinas são inativadas com formaldeído. No entanto, outras substâncias podem ser empregadas, como o fenol, o etilenoamino binário, a saponina, o tratamento térmico entre outros (BUONAVOGLIA et al., 1998; DE LA FE et al., 2004). Tola et al. (1999) ao utilizarem diversos tipos de inativantes em vacinas contra agalaxia contagiosa demonstraram que a saponina apresentou ótima capacidade de manutenção das proteínas imunogênicas do antígeno e manutenção de níveis de anticorpos por um período superior a seis meses.

Nesse mesmo caminho, De La Fe et al. (2004) demonstraram que o formaldeído, fenol e etilenoamino binário foram eficientes para inativação de *M.*

agalactiae, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. putrefaciens* mantendo a capacidade imunogênica das amostras, podendo ser utilizados na preparação de vacinas contra AC.

Leon-Vizcaíno et al. (1995) produziram uma vacina inativada e estabeleceram diferentes protocolos vacinais em um rebanho de 400 caprinos e observaram que houve redução dos sinais clínicos e que os animais que receberam três doses de vacina apresentaram maior resistência à infecção experimental que os vacinados com duas doses.

A eficiência das vacinas está diretamente relacionada com a qualidade do antígeno, o tipo de adjuvante e as condições de saúde dos animais imunizados. Adjuvantes como o hidróxido de alumínio e o óleo mineral são constantemente utilizados. Buonavoglia et al. (1998) e Greco et al. (2002) observaram que vacina inativada adsorvida com adjuvante oleoso induziu títulos mais altos e mais duradouros do que a vacina com hidróxido de alumínio como adjuvante. Contudo, vale salientar que adjuvantes oleosos produzem maior reação no local de administração que os adjuvantes aquosos, podendo interferir no diagnóstico de lesões causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, infecção comum entre os rebanhos do Nordeste brasileiro.

Recentemente, De La Fe et al. (2007) detectaram anticorpos anti-*M. agalactiae* durante seis meses após vacinação quando hidróxido de alumínio foi utilizado como adjuvante. Os autores relatam que vacina contendo hidróxido de alumínio associado à saponina conferiu uma maior proteção dos animais quando submetidos a desafio experimental.

Como em outros países, a vacinação das matrizes antes e após o parto e aos seis meses de idade pode ser uma medida auxiliar na redução da expressão clínica da enfermidade (LEON VIZCAINO et al., 1995).

Seguindo a linha de vacinas tradicionais Buonavoglia et al. (2008) analisaram uma vacina inativada contendo três tipos de adjuvantes em diferentes concentrações e observaram que a vacina constituída por Montanide ISA-563, Marcol-52 e Montane-80 na proporção de 30:63:7, respectivamente, apresentou os melhores resultados em termos de produção de anticorpos. A desvantagem da vacina com tripla emulsão oleosa foi uma maior reação no local da inoculação. Em relação a persistência de anticorpos, em outro estudo utilizando a mesma vacina, Buonavoglia et al. (2010) constataram que os ovinos vacinados e desafiados aos 5 e 8 meses

após o reforço vacinal não desenvolveram sinais clínicos de AC. No entanto, apresentaram declínio dos títulos de anticorpos mesmo após o desafio, ao contrário do grupo controle, que tiveram sinais clínicos e aumentaram os níveis de anticorpos.

Vacina de DNA contra AC preparada a partir do gene p48 de *M. agalactiae*, foi capaz de induzir resposta celular e humoral quando testada em camundongos representando uma possibilidade de aplicação em pequenos ruminantes (CHESSA et al., 2009).

3.4 Situação no Brasil

No Brasil não havia relatos ou confirmação da AC até 2001, entretanto a ocorrência de sinais clínicos de AC simultaneamente em caprinos de um mesmo rebanho no Estado da Paraíba resultou na suspeita de agalaxia contagiosa causada por *Mycoplasma agalactiae*, microrganismo até então exótico no país. A confirmação se deu por isolamento e pelo teste de imunoperoxidase indireta (NASCIMENTO et al., 2002).

Posteriormente, Azevedo et al. (2006) diagnosticaram a doença também em Pernambuco e no Rio Grande do Norte. Os autores relataram a morte de 14 (14,73%) das 89 cabras em lactação e de sete (6,4%) dos 109 cabritos de um rebanho constituído por animais de raças leiteiras de alto valor zootécnico. Em um segundo surto, as taxas de mortalidade foram de 36,5% entre os cabritos, 22,9% entre os cordeiros e 3,3% entre as cabras em lactação. Os rebanhos que apresentaram estes casos tinham em comum a participação em exposições de animais, embora os surtos tenham ocorrido com intervalo de 3-4 meses. Os animais desses rebanhos foram medicados com tilosina e tetraciclina, obtendo resultados clínicos favoráveis, mas com manutenção de portadores.

Levantamento por amostragem revelou que 20% dos criatórios das microrregiões do Cariri (oriental e ocidental), maior bacia produtora de leite caprino do estado da Paraíba, foram positivos para AC, demonstrando a ampla distribuição da doença (BANDEIRA et al., 2007). Dos Animais testados 7,5% apresentaram resultado positivo para *M. agalactiae*.

A doença tem se disseminado entre os rebanhos leiteiros pela falta de conhecimento das medidas preventivas por parte dos produtores, pela incapacidade de fiscalização dos órgãos de defesa sanitária dos estados e municípios e pelo

intenso comércio de animais vivos, destinados ao abate e para a reprodução. A enfermidade constitui-se em uma das maiores preocupações de pesquisadores e produtores desta região nos últimos anos, sobretudo pelo elevado custo para o controle da doença nos rebanhos.

Em estudo recente, Campos et al. (2009) padronizaram um ELISA Indireto para diagnóstico da enfermidade utilizando antígeno sonicado de *M. agalactiae* e como conjugado proteína G-peroxidase (ELISA-Gs), o que tem permitido a rápida identificação de caprinos infectados na região Nordeste do Brasil.

Utilizando o ELISA-Gs, Alcântara (2010), em levantamento realizado em 20 rebanhos caprinos leiteiros distribuídos em municípios da microrregião do Cariri ocidental paraibano, detectou a presença de anticorpos anti-*M. agalactiae* em 307 (56,43%) das 544 amostras analisadas. A taxa de animais positivos variou de 10,0% a 100% por propriedade.

Nos rebanhos acometidos o controle tem se fundamentado no sacrifício de animais infectados, antibioticoterapia e segregação de animais, de acordo com as condições econômicas e sociais dos produtores (AZEVEDO, 2005). Alcântara et al. (2003) obtiveram crias livres da infecção a partir da indução do parto e separação das crias no momento do parto, alcançando bons resultados com este procedimento.

Considerando que o uso da antibioticoterapia, apesar de reduzir os sintomas, não induz à cura total (CORRALES et al., 2007) e que este tipo de tratamento requer longo período, o que resulta em resistência bacteriana, permanência do agente no meio ambiente, bem como a presença de resíduos no leite, têm sido pesquisadas alternativas terapêuticas.

Marinho (2008) avaliou um medicamento homeopático (bioterápico), produzido com *M. agalactiae* isolado de uma cabra com AC, para o tratamento da doença em caprinos de surtos ocorridos na Paraíba. Este tratamento resultou no desaparecimento dos sintomas em todos os animais, bem como na melhora no desempenho produtivo e ausência de novos surtos nos rebanhos monitorados durante 12 meses. O tratamento para AC através da bioterapia mostrou-se viável, por ser compatível com o manejo da pecuária orgânica, não oferecendo risco para a saúde humana e animal, bem como da redução dos custos com o medicamento.

Diante da realidade há necessidade de associação destas ações, com ênfase no diagnóstico e no desenvolvimento de vacinas com amostras brasileiras, como

medidas estratégicas de controle da doença, contribuindo para a sustentabilidade da atividade na região semiárida.

Neste sentido, Campos (2012) testou a eficiência de três vacinas inativadas produzidas com amostra brasileira de *M. agalactiae* e adsorvidas com diferentes adjuvantes em caprinos e ovinos, obtendo boa resposta em termos de produção de anticorpos anti-*M. agalactiae* e proteção contra a infecção experimental.

Acompanhamento de surtos em diferentes áreas dos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte têm sido realizados com o objetivo de estabelecer medidas de controle e tratamento eficazes e para melhor entender a dinâmica da infecção em nossa região (comunicação pessoal).

Referências Bibliográficas

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.

ALCÂNTARA, M.D.B. **Soroprevalência da agalaxia contagiosa e vacinação experimental em caprinos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2010. 44p.

ANTUNES, N.T.; TÁVIO, M.M.; ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R.S.; POVEDA, C.; DE LA FE, C.; GIL, M.C.; POVEDA, J.B. In vitro susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae*. **Vet. J.**, v. 177, p. 436-438, 2008.

ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N.T.; ROSALES, R.S.; DE LA FE, C.; POVEDA, C.; POVEDA, J.B.; DAVEY, H.M. Flow cytometric method for the assessment of the minimal inhibitory concentrations of antibacterial agents to *Mycoplasma agalactiae*. **Cytometry A.**, v. 69, n. 10, p. 1071-1076, 2006.

AZEVEDO, E.O. **Aspectos clínicos, microbiológicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 2005. 135p.

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. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

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.

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.

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.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; GRECO, M.F.; D'ABRAMO, M.; LATRONICO, F.; FASANELLA, A.; DECARO, N. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. **Res. Vet. Sci.**, v. 88, n. 1, p. 16-19, 2010.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; QUARANTA, V.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiol.**, v. 31, p. 117-123, 2008.

BUONAVOGLIA, D.; FASANELLA, A.; SAGAZIO, P.; TEMPESTA, M.; IOVANE, G.; BUONAVOGLIA, C. Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. **New Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. 209-212, 1998.

CAMPOS A.C.; TELES J.A.A.; AZEVEDO E.O.; NASCIMENTO E.R.; OLIVEIRA, M.M.M.; NASCIMENTO S.A.; CASTRO R.S. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Rumin. Res.**, v. 84, p. 70-75, 2009.

CAMPOS, A.C. **Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa.** Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 2012. 75p.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y.; BASCUNANA, C.R.; BOLSKE, J.G.; MATTSON, J.B.; MOLINA, C.F.; JOHANSSON, K.-E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 47, p. 183-190, 1995.

CHESSA, B.; PITTAU, M.; PURICELLI, M.; ZOBBA, R.; CORADDUZZA, E.; DALL'ARA, P.; ROSATI, S.; POLI, G.; ALBERTI, A. Genetic immunization with the

immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. **Vet. Sci.**, v. 86, n. 3, p. 414-420, 2009.

CORRALES, J.C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SANCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Rum. Res.**, v. 68, p.154–166, 2007.

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.

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

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.

DaMASSA, A.J.; WAKENELL, P.S.; BROOKS, D.L. Review Article. *Mycoplasmas* of goats and sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 101-113, 1992.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; RAMÍREZ, A.S.; POVEDA, J.B. Inactivation of *Mycoplasma* species involved in contagious agalactia. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 117, n. 1-2, p. 1-5, 2004.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; TOLA, S.; POVEDA C.; POVEDA, J.B. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2340-2345, 2007.

DOUTRE, M.; PERREAU, P.; NDIAYE, A.M. Un foyer d'agalaxie contagieuse de la chèvre à *Mycoplasma agalactiae* au Sénégal. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 34, n. 1, p. 11-14, 1981.

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 cytoadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 10, p. 5612–5621, 2002.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; SCHLATTER, Y.; FREY, J.; VILEI, E.M. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2814-2822, 2001.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAB, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats preliminary studies on vaccines. **J. Comp. Path.**, v. 80, p. 345-359, 1970.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAB, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats immunity of lactating ewes vaccinated before mating with live or dead vaccines. **J. Comp. Path.**, v. 81, p. 393-400, 1971.

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.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, D.; ALIBERTI, A.; FASANELLA, A. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 17-20, 2002.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D.D. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. **Mol. and Cel. Probes.**, v. 15, p. 21-25, 2001.

KINDE, H.; DAMASSA, AL 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, p. 423-427, 1994.

KITTELLBERGER, R.; O'KEEFE, J.S.; MEYNELL, R.; SEWELL, M.; ROSATI, S.; LAMBERT, M.; DUFOUR, P.; PÉPIN, M. Comparison of four diagnostic tests for the

identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. **N. Z. Vet. J.**, v. 54, n.1, p. 10-15, 2006.

KÖNIGSSON, M. H.; BOLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. **Vet. Microbiol.**, v. 85, n. 3, p. 209-220, 2002.

LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P.; CABASSE, E.; VITU, C.; PÉPIN, M. Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 10, p. 326-330, 1998.

LEON VIZCAINO L.; GARRIDO ABELLAN, F.; CUBERO PABLO, M.J.; PERALES, A. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. **Vet. Rec.**, v. 137, n. 11, p. 266-269, 1995.

LORIA, G.R.; SAMMARTINO, C.; TAMBURELLO, A.; EMANUELE, M.C.; AYLING, R.D.; NICHOLS, R.A.J. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma agalactiae* strains isolated from sheep in Sicily. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 60, 2002.

MADANAT A., D. ZENDULKOVÁ, P. LÁNY, Z. POSPÍŠIL, P. ČÍHAL. Prevalence of *Mycoplasma agalactiae* Antibodies in Czech and Jordanian Herds of Small Ruminants. **Acta Vet. Brno.**, v. 71, p. 37-44, 2002.

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

MARENDA, M.S.; VILEI, E.M.; POUMARAT, F.; FREY, J.; BERTHELOT, X. Validation of the suppressive subtractive hybridization method in *Mycoplasma agalactiae* species by the comparison of a field strain with the type strain PG2. **Vet. Res.**, v. 35, n. 2, p. 199-212, 2004.

MARINHO, M.L. **Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos.** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2008. 118 p.

MATTSSON, J.G.; GERSDORF, H.; GOBEL, U.B.; JOHANSSON, K.E. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA. **Mol. Cell. Probes.**, v. 5, n. 1, p. 27-35, 1991.

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.

NICHOLAS, R.A.J. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Rum. Res.**, v. 45, p. 145–149, 2002.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2011. Disponível em: <http://web.oie.int/wahis/public.php>. Acesso em 05 de fevereiro de 2012.

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.

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. **Biosci. Rep.**, v. 19, n. 5, 1999.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiol. Molecul. Biol. Reviews**, v. 62, n.4, p. 1094-1156, 1998.

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. An improved method for the recovery of Mycoplasmas from the external ear canal of goats. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 9, n. 2, p.156-158, 1997.

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.

SANTONA, A.; CARTA, F.; FRAGHI, P.; TURRINI, F. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 1, p. 171-1716, 2002.

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. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz Mycoplasmol. (IOM)**, XIV, Vienna, p. 49, 2002.

TOLA, S.; CROSBEDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 45-50, 2001.

TOLA, S.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; ANGIOI, P.P.; ROCCHIGIANI, A.M.; LEORI, G. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.** v. 51, p. 77-84, 1996.

TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; ROCCHIGIANI, A. M.; IDINI, G.; ANGIOI, P. P.; LEORI, G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 22, p. 2764-2768, 1999.

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.

4 Artigo Científico 1

Caracterização bioquímica e protéica de *Mycoplasma agalactiae* do Brasil.

Biochemical and protein characterization of *Mycoplasma agalactiae* in Brazil.

RESUMO

O *Mycoplasma agalactiae* é o principal agente responsável pela agalaxia contagiosa (AC) em pequenos ruminantes, caracterizada clinicamente por mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. A infecção dissemina-se rapidamente e tem determinado perdas econômicas consideráveis em rebanhos leiteiros do Nordeste brasileiro. Com o objetivo de caracterizar *M. agalactiae*, isolados de leite caprino obtidos de animais de rebanhos infectados foram cultivados em meio Hayflick modificado e submetidos a testes bioquímicos, reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers para o gene 16S rRNA, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot* (WB). Em meio de cultura, os isolados formaram colônias com aspecto de ovo frito, produziram filmes e manchas, não degradaram arginina nem fermentaram glicose. Na PCR um fragmento de 360pb foi amplificado caracterizando-os como *M. agalactiae*. As amostras apresentaram similaridade no perfil protéico com bandas variando de 30 a 135 kDa no SDS-PAGE. Uma proteína de aproximadamente 48 kDa (P48) apresentou maior antigenicidade no *Western Blot*. A baixa variabilidade antigênica detectada e a imunogenicidade da P48 são benéficas para a utilização das amostras em testes diagnósticos e para produção de vacinas.

Palavras-chave: Agalaxia Contagiosa, PCR, SDS-PAGE, *Western Blot*, diagnóstico

ABSTRACT

Mycoplasma agalactiae is the main agent of contagious agalactia (CA) in small ruminants, a disease characterized clinically by mastitis, agalactia, polyarthritis and keratoconjunctivitis. The infection spreads rapidly and has given considerable economic losses in dairy herds in northeastern Brazil. To characterization of *M. agalactiae* isolates of goat milk obtained from infected animals herds were cultured in Hayflick modified medium and were submitted to biochemical tests, polymerase chain reaction (PCR) using primers for 16S rRNA, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blot (WB). In culture medium, the isolates formed colonies with fried egg appearance, produced films and spots, not degraded arginine or ferment glucose. By PCR, fragment of 360pb was amplified characterizing them as *M. agalactiae*. The samples showed similarity in the protein profile with bands ranging from 30 to 135 kDa in SDS-PAGE. A protein of approximately 48 kDa (P48) showed higher reactivity in Western Blot. The low variability and immunogenicity of the antigen detected P48 are beneficial for use in diagnostic and vaccine production.

Keywords: Contagious Agalactia, SDS-PAGE, Western Blot, diagnostic

1 Introdução

A agalaxia contagiosa (AC) dos ovinos e caprinos causada por *Mycoplasma agalactiae* está mundialmente disseminada, ocorrendo endemicamente na maioria dos países mediterrâneos, oeste da Ásia, África e EUA (DaMASSA, 1983; EGWU et al., 2001). Os sinais clínicos característicos são mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. A infecção dissemina-se rapidamente no rebanho determinando perdas consideráveis, sobretudo pela redução acentuada na produção de leite e morte dos animais (DOUTRE et al., 1981; REAL et al., 1994; EGWU et al., 2001; GIL et al., 2003).

No Brasil, a ocorrência destes sinais clínicos simultaneamente em caprinos de um mesmo rebanho no Estado da Paraíba em 2001, resultou no diagnóstico de AC causada por *M. agalactiae*, microrganismo até então exótico no país (NASCIMENTO et al., 2002; OIE, 2011). Posteriormente, a doença foi diagnosticada também em

Pernambuco e Rio Grande do Norte. Surtos ocorreram com taxas de morbidade de até 100% e mortalidade em animais jovens e adultos em torno de 90% e 5%, respectivamente (AZEVEDO et al., 2002; 2006). Azevedo et al. (2006) utilizando *primers* para o gene 16S rRNA de *M. agalactiae*, identificaram *M. agalactiae* através da PCR no Brasil.

As melhores estratégias utilizadas para a prevenção e controle da AC são a realização de testes sorológicos para acompanhamento do rebanho e o emprego da vacinação. Nesse sentido, um ELISA Indireto (CAMPOS et al., 2009) tem sido utilizado como ferramenta diagnóstica (ALCÂNTARA, 2010) e a eficiência de três vacinas produzidas com amostra brasileira de *M. agalactiae* foi testada (CAMPOS, 2012) na Região Nordeste do Brasil, onde a doença é emergente (AZEVEDO et al., 2006).

Até a década de 1970, *M. agalactiae* foi considerada uma espécie antigenicamente uniforme, mas estudos mais recentes demonstram sua heterogeneidade antigênica e a sua habilidade em modificar a camada superficial de sua membrana plasmática (SOLSONA et al., 1996; TOLA et al., 1996; RAZIN, 1999; KÖNIGSSON et al., 2002).

Diferentes lipoproteínas estão expostas na membrana celular e estão associadas com a aderência do micoplasma às células hospedeiras, com a modulação de citocinas, entre outras funções. Quatorze proteínas com pesos moleculares entre 24 e 105 kDa foram caracterizadas como indutoras de resposta imunológica em caprinos (DE LA FE et al., 2006). Algumas dessas proteínas foram caracterizadas individualmente e estudos sobre sua presença em diferentes fases da infecção têm sido realizados (TOLA et al., 1997; 2001; FLEURY et al., 2001, 2002; SANTONA et al., 2002; FUSCO et al., 2007).

Amostras brasileiras de *M. agalactiae* precisam ser melhor caracterizadas para utilização em métodos de diagnóstico e produção de vacinas. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização de isolados de *M. agalactiae* através do cultivo em meio Hayflick modificado, testes bioquímicos e reação em cadeia da polimerase (PCR), e investigar o perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a imunogenicidade destas proteínas por *Western Blot* (WB).

2 Material e métodos

2.1 Amostras, condições de crescimento e identificação

Oito amostras de *M. agalactiae*, isoladas previamente em rebanhos caprinos com surtos de AC nos Estados da Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN), foram utilizadas para esse estudo (Tabela 1). As amostras foram cultivadas em meio Hayflick modificado, suplementado com 20% de soro eqüino e incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37°C e em seguida identificadas por meio de provas bioquímicas (fermentação de glicose e degradação da arginina).

Tabela 1. Lista de isolados brasileiros de *Mycoplasma agalactiae* analisados.

Amostra	Acesso [*]	Área geográfica	Material	Espécie	Data de isolamento
BrPB1.01	JQ612158	S. J. de Espinharas, PB	Leite	Caprina	2002
BrRN1.01	JQ612165	Afonso Bezerra, RN	Leite	Caprina	2002
BrPB2.02	JQ612157	Cabaceiras, PB	Leite	Caprina	2007
BrPB3.03	JQ612156	Caturité, PB	Leite	Caprina	2009
BrPB4.04	JQ612162	Prata, PB	Leite	Caprina	2009
BrRN2.02	JQ612163	Lajes, RN	Leite	Caprina	2010
BrRN2.03	JQ612161	Lajes, RN	Leite	Caprina	2010
BrRN2.04	JQ612159	Lajes, RN	Leite	Caprina	2010

^(*) Número de acesso GenBank

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Os cultivos de *M. agalactiae* foram submetidos à extração de DNA por kit comercial (RTP Bactéria DNA Mini Kit®, INVITEK). Logo após a extração, as amostras foram analisadas em fotômetro (BioPhotometer plus Eppendorf) para verificação concentração da DNA ($\mu\text{g/mL}$) e determinação do grau de pureza através do coeficiente $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$.

Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de amostra de *Mycoplasma agalactiae* isolada e identificada por Azevedo (2005), e como controle negativo, o DNA foi substituído por água ultra pura.

Os primers utilizados foram os mesmos descritos por Chávez-González et al. (1995), (F: 5'-CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG-3' e R: 5'-CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C-3'), e a amplificação realizada de acordo com Azevedo et al. (2006). O ciclo de termociclagem foi constituído por uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, sucedidos de uma extensão final por 10 minutos.

Após a termociclagem, os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1,2%) previamente corados com Blue green loading dye I (LGC Biotecnologia). As bandas foram visualizadas em transiluminador e fotografadas.

2.3 Soros Controle

Para esse estudo, foram selecionados soros caprinos previamente testados através de ELISA indireto utilizando antígeno sonificado de *M. agalactiae* e proteína G peroxidase como conjugado (ELISA-Gs) como descrito por Campos et al., (2009). Cinco soros com densidade óptica (DO) elevada, oriundos de caprinos com sinais clínicos de AC compuseram um *pool* e foi utilizado como controle positivo (CP). Um *pool* de cinco soros de animais não infectados e testados através do ELISA-Gs foi utilizado como controle negativo (CN).

2.4 SDS-PAGE

Para análise do perfil protéico, os oito isolados de *M. agalactiae* em caldo Hayflick modificado foram centrifugados a 12000g por 20 minutos e ressuspensos inicialmente em PBS, pH 7,6. A concentração protéica dos antígenos foi determinada utilizando filtro de 280nm através do BioPhotometer plus (Eppendorf, Alemanha).

Quinze microgramas de proteína de cada amostra foram ressuspensos em tampão de lise [Tris-HCl 0,6M, pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 8% (v/v) 2-mercaptoetanol, 30% (v/v) glicerol e 0,015% (p/v) azul de bromofenol] e aquecidos a 100°C por 5 minutos. As amostras lisadas foram submetidas a SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada a 250V e 60mA durante 50 minutos. Para estimar o peso molecular das proteínas, foi utilizado marcador de peso molecular (33,5 a 230 kDa). As proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 [0,05% (p/v) azul brilhante de Coomassie R-250, 7% (v/v) ácido acético, 25% (v/v) metanol].

2.5 Dot Blot

Membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm cortadas em tiras de 7cm x1cm foram adsorvidas com 6µg do antígeno total de *M. agalactiae* (amostra BrPB3.03) em tampão de lise para *dot-blot* [600mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (p/v) SDS, 8% (v/v) 2-mercaptoetanol,], puro e diluído 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. Após secagem, por 15 minutos a temperatura ambiente, as fitas foram lavadas três vezes em PBS-T 0,1% (PBS pH 7,6; 0,1% (v/v) Tween 20) por cinco minutos, e bloqueadas com solução de bloqueio e diluição (PBS-T 0,1%; 2% (p/v) leite em pó desnatado [LPD]) a 37°C durante 30 minutos. As tiras foram novamente lavadas e os CP e o CN diluídos 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 e 1/200 em solução de bloqueio e diluição, foram adicionados e incubados a 37°C durante 30 minutos, seguida de nova etapa de lavagem. As tiras foram incubadas com o conjugado anti-cabra peroxidase (CASTRO,1998) diluído 1/100 e 1/200 em solução de bloqueio e diluição a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as tiras foram lavadas cinco vezes por cinco minutos, e incubadas em tampão citrato 0,1M, pH5,0 contendo 0,3 mg/ml de 3'-3'-5'-5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,38% de peróxido de hidrogênio.. A reação foi interrompida pela adição de água destilada após cinco minutos.

As diluições dos antígenos, soros e conjugado foram definidas com o objetivo de se obter as melhores condições de diferenciação entre soros positivos e negativos e maior rendimento dos reagentes para utilização no *Western Blot*.

2.6 Western Blot

Dois isolados provenientes da Paraíba e do Rio Grande do Norte, BrPB3.03 e BrRN1.01 respectivamente, foram selecionados para utilização no WB. A escolha da amostra BrPB3.03 foi baseada na intensidade e quantidade de bandas expressas em SDS-PAGE e da BrRN1.01, por se tratar de amostra utilizada como antígeno do ELISA indireto padronizado por Campos et al. (2009). Após eletroforese, as proteínas e o marcador de peso molecular foram transferidos para membrana de nitrocelulose de 0,45 μm , pelo método semi-úmido, durante 70 minutos a 8V e 280mA (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Após a transferência, as membranas foram lavadas três vezes em PBS-T 0,1% (PBS pH 7,6; 0,1% (v/v) Tween 20) por cinco minutos, e bloqueadas com solução de bloqueio e diluição a 37°C durante 30 minutos. As membranas foram novamente lavadas e os CP e o CN diluídos 1/200, foram adicionados e incubados a 37°C durante 30 minutos. Após nova lavagem as membranas foram incubadas com conjugado anti-cabra peroxidase (CASTRO,1998) diluído 1/200 a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, as tiras foram lavadas cinco vezes por cinco minutos, e reveladas em tampão citrato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,3 mg/ml de 3'-3'-5'-5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e 0,38% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após cinco minutos pela adição de água destilada após cinco minutos.

3 Resultados e discussão

As amostras isoladas apresentaram colônias com aspecto de “ovo frito”, produziram filmes e manchas, não fermentaram glicose e não degradaram arginina (Figuras 1A e 1B). Houve amplificação de um fragmento de 360 pb em todas as amostras submetidas a PCR (Figura 2). Em trabalho paralelo, essas amostras foram submetidas a sequenciamento de fragmento de DNA de 360 pb correspondente ao

gene 16S rRNA de *M. agalactiae*. As amostras apresentaram homologia de 99% com amostras de referência depositadas no GenBank (CAMPOS, 2012). A análise destes resultados confirma como *M. agalactiae* as amostras analisadas.

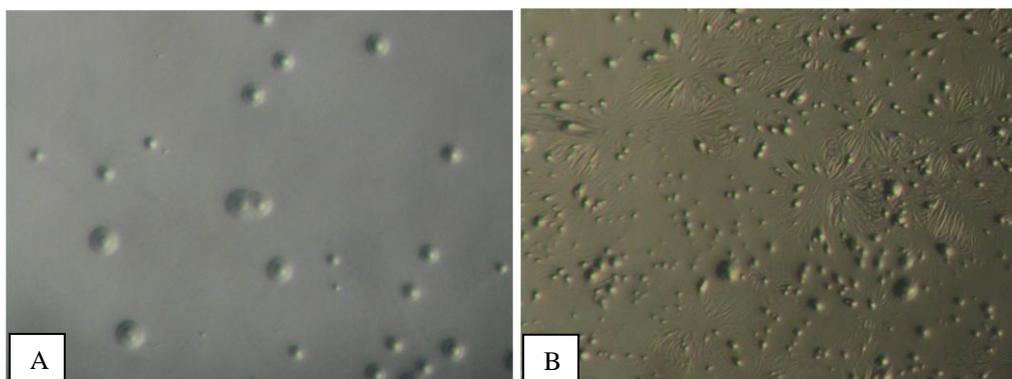


Figura 1. Características dos isolados de *M. agalactiae* em meio Hayflick sólido. A: Colônias com aspecto de “ovo frito”. B: Presença de colônias e Filmes.

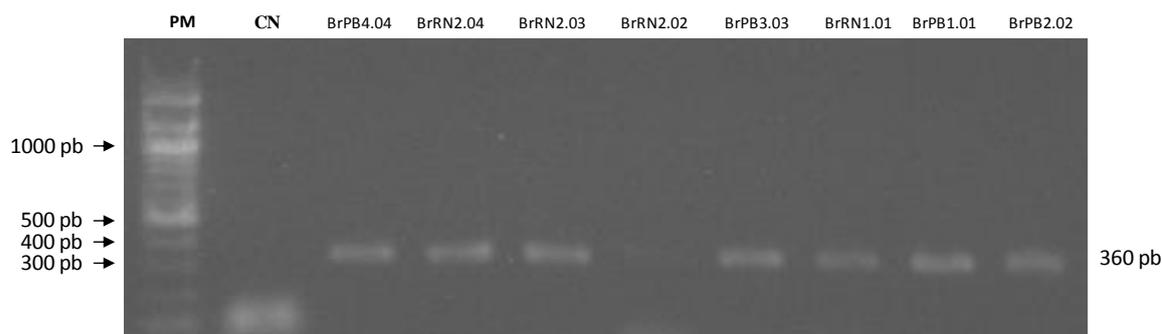


Figura 2. PCR para o gene 16S rRNA dos isolados de *M. agalactiae*. PM: Peso Molecular. CN: Controle Negativo. Linhas 3 a 10: identificação das amostras analisadas.

Através do SDS-PAGE, os isolados de *M. agalactiae* apresentaram similaridade na expressão de proteínas (Figura 3). Observações semelhantes foram relatadas por Tola et al. (1996) que verificaram 100% de similaridade entre isolados de *M. agalactiae* da Itália, independentemente da região geográfica, e por Solsona et al. (1996) que demonstraram pequenas diferenças na localização e intensidade de bandas em amostras da Romênia, Espanha e França. Por outro lado, De La Fe et al. (2006) observaram alto grau de variabilidade protéica em amostras isoladas na Espanha.

Nesse estudo, proteínas com pesos moleculares de aproximadamente 30, 55, 78, 97 e 230 kDa foram observadas em todos os isolados analisados através do

SDS-PAGE. Pelo menos quatro das oito amostras (BrPB3.03; BrRN1.01; BrPB1.01; BrPB2.02) apresentaram uma proteína com aproximadamente 48 kDa, de baixa intensidade.

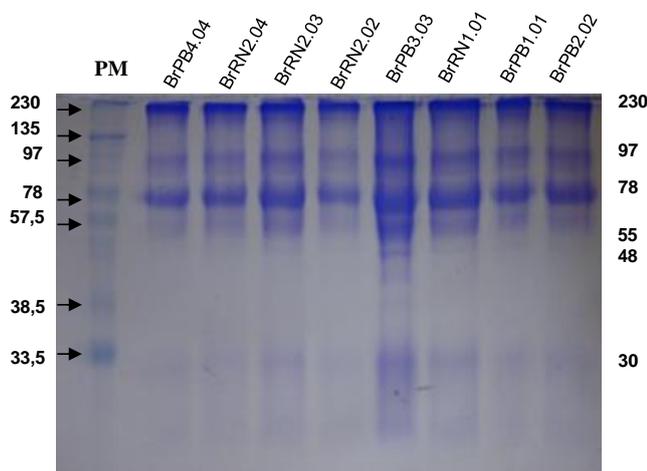


Figura 3. Perfil protéico de *M. agalactiae* obtido por SDS-PAGE e corado com Coomassie Blue R-250. Linhas 2 a 9: identificação das amostras analisadas. O peso molecular está em kDa. A direita proteínas de *M. agalactiae*.

As condições de diluição do conjugado, antígeno e soro comparados através do *dot-blot* estão demonstrados nas Figuras 4 e 5. Verifica-se em todas as diluições utilizadas uma ótima discriminação dos positivos e negativos, sendo possível a aplicação da técnica com economia de reagentes. O conjugado diluído 1/200 apresentou uma boa intensidade de reação utilizando o antígeno puro e o soro diluído 1/200.

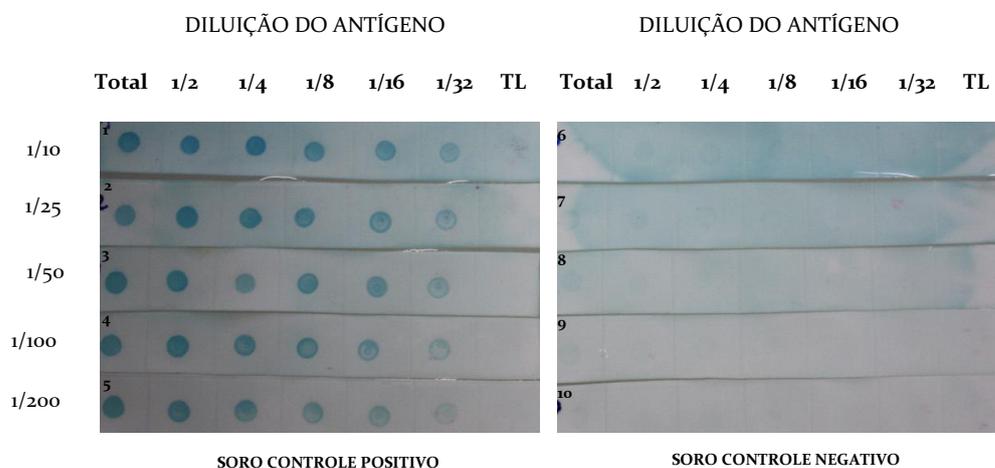


Figura 4. Resultado do *dot-blot* utilizando soros positivos e negativos diluídos de 1/10 até 1/200, antígeno total e diluído 1/2 até 1/32 e conjugado anti-cabra peroxidase 1/100. TL = tampão de lise.

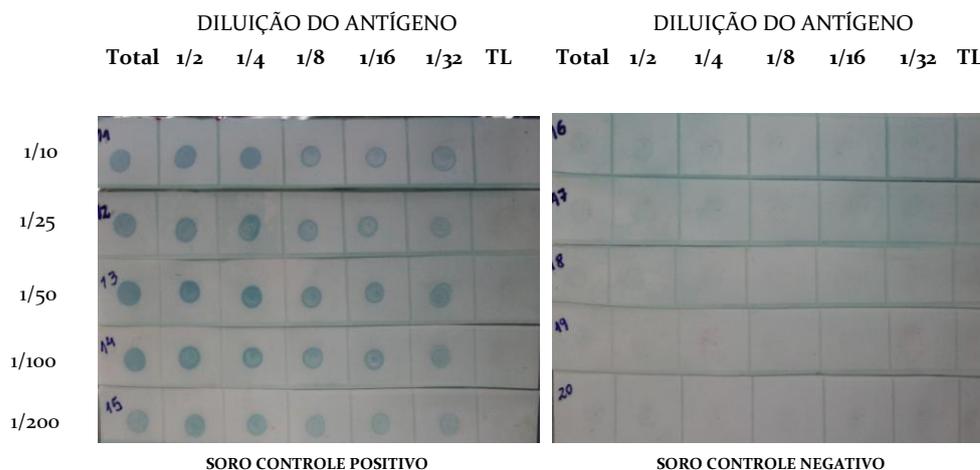


Figura 5. Resultado do dot-blot utilizando soros positivos e negativos diluídos de 1/10 até 1/200, antígeno total e diluído 1/2 até 1/32 e conjugado anti-cabra peroxidase 1/200. TL = tampão de lise.

A similaridade imunogênica entre as amostras está demonstrada no *Western Blot* (Figura 6), com reconhecimento de três proteínas comuns com pesos moleculares aproximados de 135, 55 e 48 kDa. Fusco et al. (2007), ao analisarem amostras de *M. agalactiae* isoladas de diversas regiões da Itália, detectaram a presença da P80, P55 e P48 em 92%, 85% e 60% das amostras, respectivamente. Em nosso estudo, reações anti-P80 não foram observadas, como normalmente relatado por outros autores na fase inicial da infecção (TOLA et al, 2001; SANTONA et al, 2002; De La Fe et al., 2006; FUSCO et al., 2007), fato que pode estar relacionado com a fase da infecção dos indivíduos que compuseram o *pool* de soros, visto que no SDS-PAGE uma proteína de aproximadamente 78 KDa está presente em todas as amostras analisadas.

Interessante notar que no SDS-PAGE a P48 não aparece com muita intensidade, porém no WB foi imunodominante. Autores sugerem que a P48 possui uma potente atividade imunoestimulante, similar a outras lipoproteínas bacterianas, sendo um dos principais antígenos durante a infecção pelo *M. agalactiae* (ROSATI et al, 1999; 2000). Santona et al. (2002) descreveram a imunodominância da P55, proteína associada a capacidade de citoadesão de *M. agalactiae* às células hospedeiras. As duas proteínas foram observadas em nossas amostras e há relatos da presença de anticorpos contra essas proteínas desde a fase inicial da infecção (ROSATI et al, 1999; 2000; SANTONA et al., 2002).

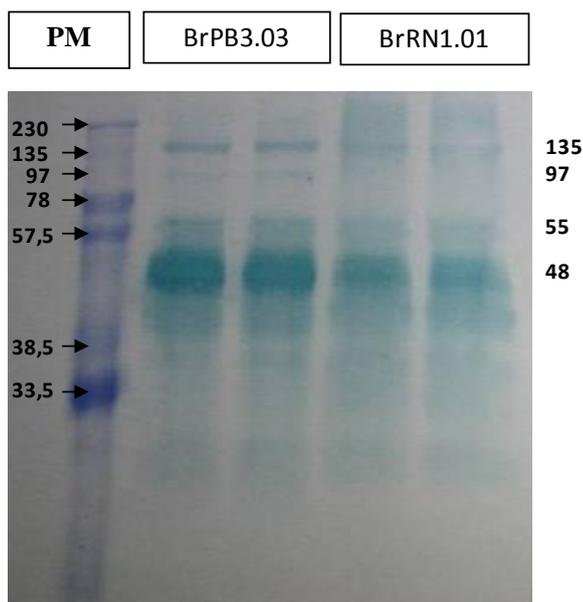


Figura 6. Perfil imunogênico de *M. agalactiae* através de WB utilizando *pool* de soros positivos (CP). BrPB3.03 amostra proveniente da Paraíba e BrRN1.01 do Rio Grande do Norte. O peso molecular está em kDa. A direita proteínas de *M. agalactiae*.

Foi possível observar a presença de uma banda imunogênica de aproximadamente 97 kDa na amostra BrPB3.03, proteína ausente na revelação da amostra BrRN1.01. De La Fe et al. (2006), analisando amostras de diversas regiões da Espanha, observaram a presença de uma banda específica de 96-97 kDa apenas nas amostras isoladas das Ilhas Canárias. Até o momento a função desta proteína não foi definida. Nossos resultados revelaram ainda a presença de uma proteína de aproximadamente 135 kDa detectada nas duas amostras no WB mas não no SDS-PAGE, que não é descrita por outros autores como imunogênica.

As informações obtidas com esse estudo identificaram os isolados como *M. agalactiae*, revelaram semelhança no perfil protéico e uma marcante resposta imunológica para as proteínas com peso molecular de 48 e 135 kDa. Essa característica é benéfica na escolha de antígenos para serem utilizados no diagnóstico específico e na produção de vacinas para *M. agalactiae*.

Agradecimentos

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsas de estudos.

Referências bibliográficas

ALCÂNTARA, M.D.B. **Soroprevalência da agalaxia contagiosa e vacinação experimental em caprinos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2010. 44p.

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. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

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.

CAMPOS A.C.; TELES J.A.A.; AZEVEDO E.O.; NASCIMENTO E.R.; OLIVEIRA, M.M.M.; NASCIMENTO S.A.; CASTRO R.S. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Rumin. Res.**, v. 84, p. 70-75, 2009.

CAMPOS, A.C. **Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa**. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 2012. 75p.

CASTRO, R.S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios filogenéticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1998. 132p.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y.; BASCUNANA, C.R.; BOLSKE, J.G.; MATTSON, J.B.; MOLINA, C.F.; JOHANSSON, K.-E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 47, p. 183-190, 1995.

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

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; ROSALES, R.S. ANTUNES, T.; POVEDA, J.B. Characterisation of protein and antigen variability among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. **Vet. J.**, v.171, p.532–538, 2006.

DOUTRE, M.; PERREAU, P.; NDIAYE, A.M. Un foyer d'agalaxie contagieuse de la chèvre à *Mycoplasma agalactiae* au Sénégal. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 34, n. 1, p. 11-14, 1981.

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.; SCHLATTER, Y.; FREY, J.; VILEI, E.M. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2814-2822, 2001.

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

FUSCO, M.; CORONA, L.; ONNI, T.; MARRAS, E.; LONGHEU, C.; IDINI, G.; TOLA, S. Development of a sensitive and specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in sheep. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 4, p. 420–425, 2007.

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.

KÖNIGSSON, M. H.; BOLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. **Vet. Microbiol.**, v. 85, n. 3, p. 209-220, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2011. Disponível em: <http://web.oie.int/wahis/public.php>. Acesso em 05 de fevereiro de 2012.

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. **Biosci. Rep.**, v. 19, n. 5, 1999.

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.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M.; POZZI, S.; MANNELLI, A.; PITTAU, M.. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. **Vet. Microbiol.**, v. 71, p. 201-210, 2000.

ROSATI, S.; POZZI, S.; ROBINO, P.; MONTINARO, B.; CONTI, A.; FADDA, M.; PITTAU, M. P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a *malp* product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. **Infect. Immun.**, v.67, n.11, p.6213–6216, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3., 2001.

SANTONA, A.; CARTA, F.; FRAGHI, P.; TURRINI, F. Mapping antigenic sites of na immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 1, p. 171-1716, 2002.

SOLSONA, M.; LAMBERT, M.; POUMARAT, F. Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. **Vet. Microbiol.**, v. 50, p. 45-58, 1996.

TOLA, S.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; ANGIOI, P.P.; ROCCHIGIANI, A.M.; LEORI, G. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.** v. 51, p. 77-84, 1996.

TOLA, S.; MAMUNTA, D.; COCCO, M.; TURRINI, F.; ROCCHIGIANI, M.; IDINI, G.; ANGIOI, A.; LEORI, G. Characterization of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.154, p. 355-362, 1997.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 45-50, 2001.

5. Artigo científico 2

Short communication

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA confirma homogeneidade de *Mycoplasma agalactiae* no Brasil.

Partial sequencing of 16S rRNA confirms *Mycoplasma agalactiae* in Brazil.

Resumo

Mycoplasma agalactiae é o principal microrganismo causador da agalaxia contagiosa (AC), uma doença de caprinos e ovinos caracterizada por mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. Em 2001, *M. agalactiae* foi isolado e identificado de caprinos leiteiros do Brasil e a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE foi notificada. Para dar continuidade a identificação, foi realizado o sequenciamento de dez amostras de *M. agalactiae* isoladas de caprinos e ovinos de três estados onde AC tem sido relatada desde 2002: Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. Para tanto, um fragmento de DNA de 360bp do gene RNA ribossomal 16S foi amplificado por PCR e sequenciado. As sequências foram alinhadas pelo ClustalW e a árvore de distância foi criada pelo método de *neighbor-joining*, ferramentas do programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>). Como os fragmentos amplificados dos 10 isolados correspondiam ao mesmo trecho do RNA ribossômico 16S (16S rRNA), foi criada uma sequência consenso utilizando o programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Pelo BLASTn, a maior similaridade ocorreu com *M. agalactiae* (refseq sequency NR044667.1). A sequência consenso dos isolados agrupou no mesmo ramo com *Mycoplasma agalactiae*. Este trabalho confirma a presença de *M. agalactiae* no Brasil como um agente emergente em alguns estados da região Nordeste.

Palavras-chave: *Mycoplasma agalactiae*, sequenciamento, análise filogenética.

Abstract

Mycoplasma agalactiae is the major microorganism that causes Contagious Agalactia (CA), a disease of goats and sheep characterized by mastitis followed by agalactia, polyarthritis, and keratoconjunctivitis. In 2001, *M. agalactiae* was isolated and identified in dairy goats in Brazil and notified the World Organisation for Animal Health - OIE. For further identification of the agent, we analyzed the sequences from ten *M. agalactiae* isolated from goats and sheep of the three states where CA has been reported since 2002, Paraíba, Rio Grande do Norte and Pernambuco. Thus, a 360bp DNA fragment was amplified at the region 16S RNA ribosomal gene using PCR and the products were sequenced. Sequences were aligned using ClustalW and the tree from distance was created by neighbor-joining method, program tools MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>). As the amplicons of 10 isolates corresponded to the same stretch of the 16S RNA ribosomal (16S rRNA), a consensus sequence was created using the program CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). For BLASTn, the greatest similarity occurred with *M. agalactiae* (RefSeq sequency NR044667.1). The consensus sequences of isolates grouped in the same branch with *M. agalactiae*. In conclusion, this work confirms the presence of *Mycoplasma agalactiae* in Brazil as an emerging agent in some Northeastern states.

Keywords: *Mycoplasma agalactiae*, sequencing, phylogenetic analysis

Mycoplasma agalactiae é o principal microrganismo causador da agalaxia contagiosa (AC), uma doença da lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), caracterizada por mastite, agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. Em 2001, a síndrome foi registrada em rebanhos de caprinos leiteiros no estado da Paraíba, Brasil, sendo o *M. agalactiae* isolado e identificado através de provas bioquímicas e imunoperoxidase indireta (NASCIMENTO et al., 2002). A ocorrência da doença foi notificada à OIE pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Devido a pouca ênfase dada ao controle da AC, a doença se disseminou para Pernambuco e Rio Grande do Norte, estados vizinhos a Paraíba, com consequências sócio-

econômicas devido a perdas de produtividade e depreciação dos rebanhos afetados (AZEVEDO et al, 2006; BANDEIRA et al, 2008).

Em continuação a identificação do agente envolvido na AC no Brasil, foi amplificado por PCR (AZEVEDO et al., 2006), e sequenciado em analisador modelo ABI PRISM 3100, um fragmento de 360pb do gene 16S rRNA de dez amostras de *M. agalactiae*. Os isolados foram provenientes de caprinos e ovinos dos Estados da Paraíba (PB), Rio Grande do Norte (RN) e Pernambuco (PE), onde AC tem sido relatada desde 2002 (AZEVEDO et al., 2002)

As sequências foram submetidas ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html>) e receberam os seguintes números de acesso: P20BrPB03 (JQ612156), P21BrPB02 (JQ612157), P03BrPB01 (JQ612158), P14BrRN2.03 (JQ612159), P05BrPE02 (JQ612160), P17BrRN2.02 (JQ612161), P11BrPB04 (JQ612162), P18BrRN2.01 (JQ612163), P13BrPE01 (JQ612164) e P19BrRN01 (JQ612165).

As sequências de DNA foram analisadas pelo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov / BLAST) e a similaridade entre elas foi baseada nos valores de score máximo, identidade e cobertura.

As sequências foram alinhadas pelo ClustalW e a árvore filogenética foi criada pelo método de distância de *neighbor-joining*, ferramentas do programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>). Como os fragmentos amplificados dos 10 isolados correspondiam ao mesmo trecho do 16S rRNA, foi criada uma sequência consenso utilizando o programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

As sequências do gene 16S rRNA de cada isolado deste estudo apresentam mais de 99% de identidade com genes de 16S rRNA de *M. agalactiae* disponíveis no NCBI. A sequência consenso dos isolados agrupou em um único cluster com sequências do mesmo gene de *M. agalactiae* e *M. bovis* disponíveis no GenBank (Figura 1).

A alta similaridade entre as sequências dos isolados dos três estados sugere que tenham a mesma origem, fato proporcionado pela intensa comercialização interestadual de caprinos e ovinos na região Nordeste, o que favorece a disseminação de *M. agalactiae* entre os rebanhos.

Em conclusão, confirma-se a presença de *Mycoplasma agalactiae* no Brasil como um agente emergente em alguns estados do Nordeste, com livre circulação do patógeno nas três áreas estudadas.

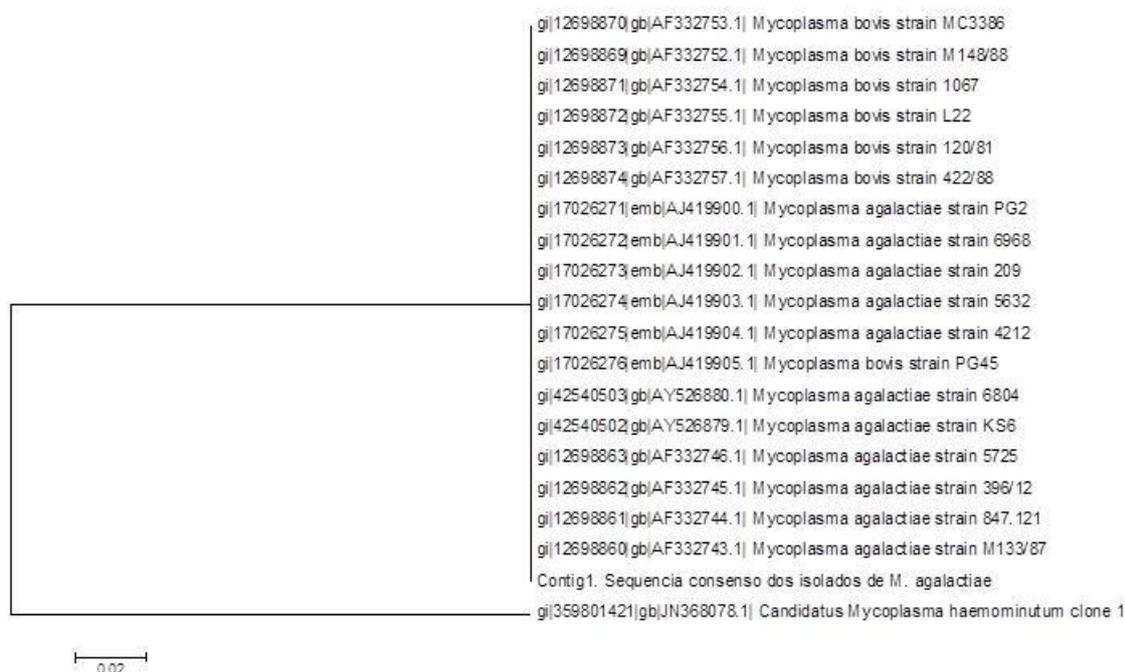


Figura 1. Árvore montada pelo programa MEGA5 após alinhamento da sequência consenso do gene 16S rRNA dos isolados com sequências de *M. agalactiae* e *M. bovis* disponíveis no GenBank. O alinhamento foi realizado pela ferramenta ClustalW e agrupamento pelo método de neighbor-joining. O gene 16S rRNA da espécie *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (gj|359801421|) foi usado como outgroup.

Agradecimentos

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsas de estudos.

Referências Bibliográficas

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. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

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.

BANDEIRA D.A., CASTRO R.R., AZEVEDO E.O., NASCIMENTO E.R., MELO L.S.S. 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, 2008.

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.

6. Artigo Científico 3

Desenvolvimento e avaliação da eficácia de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa no Brasil.

Development and evaluation of inactivated vaccines against contagious agalactia in Brazil

Resumo

A eficácia de três vacinas inativadas, preparadas com *Mycoplasma agalactiae* isolada de caprino naturalmente infectado e adsorvidas com hidróxido de alumínio (vacina 1), Montanide IMS 2215 PR VG (vacina 2) e Montanide Gel 01 PR (vacina 3) foram avaliadas em 67 caprinos e 38 ovinos, divididos em três grupos de cada espécie (Gc1 e Gov1 = vacina 1, Gc2 e Gov2 = vacina 2 e Gc3 e Gov3 = vacina 3). Todos os animais foram previamente testados para agalaxia contagiosa através de um ELISA Indireto e imunizados com duas doses de 2 ml cada, por via subcutânea, com intervalo de 21 dias. Um grupo de cinco animais de cada espécie foi utilizado como controle. Setenta e cinco dias após a segunda dose vacinal, quatro animais de cada grupo vacinado e dois do grupo controle foram desafiados com cinco ml de cultura de *M. agalactiae* contendo 10^7 ufc/ml, por via oral e acompanhados diariamente para verificação de sinais clínicos durante 60 dias. A resposta sorológica dos animais vacinados foi analisada através de um ELISA indireto. As três vacinas induziram produção de anticorpos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre caprinos e ovinos ($p > 0,05$). Animais do grupo Gc1, Gc2 e Gov2 produziram níveis de anticorpos mais elevados, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos vacinados e ao grupo controle ($p < 0,05$). Após o desafio, os animais do grupo controle apresentaram aumento de linfonodos regionais e conjuntivite, sendo que dois animais apresentaram ainda mastite e artrite. Entre os animais vacinados, foi verificado discreta conjuntivite com congestão dos vasos episclerais em quatro animais, distribuídos nos grupos Gov1, Gov2, Gov3 e Gc3. Conclui-se que a vacina 1 e 2 induziram níveis de anticorpos protetores em caprinos e ovinos, suficientes para proteção clínica dos animais, podendo ser indicadas para reduzir as perdas econômicas e prevenir a agalaxia contagiosa.

Palavras-chave: *Mycoplasma agalactiae*, anticorpos, imunização.

Abstract

The efficacy of three inactivated vaccines prepared with *Mycoplasma agalactiae* isolated from naturally infected goats and adsorbed to aluminum hydroxide (vaccine 1), Montanide IMS 2215 VG PR (vaccine 2) and Montanide Gel 01 PR (vaccine 3) was evaluated in 67 goats and 38 sheep were divided into three groups of each species (Gc1 and Gov1 = 1 vaccine, Gc2 and Gov2 = vaccine 2 and Gc3 and Gov3 = vaccine 3). All animals were previously tested for antibodies against contagious agalactiae by an Indirect ELISA and immunized with two doses of 2 ml each subcutaneously with an interval of 21 days. A group of five animals of each species was used as control. Seventy-five days after the second vaccine dose, four animals from each vaccine group and two in the control group were challenged with five ml culture of *M. agalactiae* with 10^7 cfu /ml, orally and monitored daily to check for clinical signs for 60 days. The serological response of vaccinated animals was analyzed by an Indirect ELISA. The three vaccines induced antibody production, being higher in goats than in sheep. The vaccine 2 induced higher levels than in the both species (place values). After challenge, animals in the control group showed an increase of regional lymph nodes and conjunctivitis, and two animals also showed mastitis and arthritis. Among the vaccinated animals was observed conjunctivitis with mild congestion of the episclerals vessels in four animals. It is concluded that the tested vaccines induced protective antibody levels to clinical protection of animals and their use could be an alternative to reduce economic losses and prevent contagious agalactia.

Keywords: *Mycoplasma agalactiae*, antibodies, immunization.

1 Introdução

A agalaxia contagiosa é uma doença caracterizada por mastite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite, causada por *Mycoplasma agalactiae*. A infecção dissemina-se rapidamente no rebanho, podendo atingir 30-85% dos animais em curto intervalo de tempo determinando perdas consideráveis, sobretudo pela redução acentuada na produção de leite e morte dos animais. A doença é endêmica em países da Europa, África e região central e oeste da Ásia e como uma

doença emergente em países do continente americano e no Japão (DOUTRE et al., 1981; REAL et al., 1994; EGWU et al., 2001; GIL et al., 2003; AZEVEDO et al., 2006; OIE, 2011).

No Brasil, o isolamento de *M. agalactiae* foi feito a partir de caprinos doentes em 2001, no Estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002) e logo a infecção se disseminou para os Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (AZEVEDO et al., 2006).

Dentre as medidas de controle, o uso prolongado de antibióticos tem sido adotado, mas a administração por períodos curtos (cinco a sete dias) não elimina totalmente a bactéria, mas reduz os sinais clínicos, tendo como consequência a manutenção de portadores nos rebanhos. Por outro lado, o alto custo com medicamentos faz com que os criadores abandonem o tratamento e comercializem os animais assim que os sinais clínicos desaparecem, favorecendo ainda mais a disseminação da infecção.

Alternativas de controle da doença têm sido investigadas, tais como : o uso de bioterápico em substituição aos antibióticos (MARINHO, 2008) e a separação das crias no momento do parto com oferecimento de colostro e leite livres da contaminação é outra alternativa, mas também apresenta custo elevado para sua adoção (ALCÂNTARA et al., 2003).

Em países da Europa, a vacinação tem sido adotada desde a década de 1970 (FOGGIE et al., 1970; FOGGIE et al., 1971), no entanto, só a partir da década de 1990 esta prática tem sido mais intensamente empregada com diferentes formulações. A maioria das vacinas é preparada apenas com *M. agalactiae*, mas outras são preparadas a partir da associação de *M. agalactiae* com *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Large Colony), *M. putrefaciens*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* (LEÓN VIZCAÍNO et al., 1995; TOLA et al., 1999; GRECO et al., 2002; DE LA FE et al., 2007; BUONAVOGLIA et al., 2008; BUONAVOGLIA et al., 2010).

Na maioria das vezes, as vacinas utilizam hidróxido de alumínio ou óleo mineral como adjuvantes, o que influencia no tempo de estimulação imunológica e conseqüentemente, proteção dos animais. No caso de AC, tem-se observado que as vacinas contendo hidróxido de alumínio protegem por aproximadamente seis meses, enquanto o óleo mineral pode chegar a 11 meses (DE LA FE et al., 2007;

BUONAVOGLIA et al., 1998). Estes períodos podem ser potencializados se a vacina for preparada com um ou mais adjuvantes. No entanto, deve-se atentar para uma maior reação no local da inoculação, com a formação de nódulos persistentes (BUONAVOGLIA et al., 2008).

A imunização como estratégia de prevenção e controle da Agalaxia Contagiosa no Brasil ainda não é uma realidade, em função da inexistência de vacinas no país. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar a eficiência de vacinas contra *M. agalactiae* preparadas com diferente adjuvantes.

2 Material e métodos

2.1 Amostra, condições de crescimento, clonagem e produção do antígeno

Amostra brasileira de *Mycoplasma agalactiae* (BrPB3.03) previamente isolada e caracterizada (CAMPOS, 2012), foi cultivada durante 96 horas em caldo Hayflick modificado, enriquecido com 20% de soro eqüino inativado.

Após repique em agar Hayflick, uma colônia da amostra de *M. agalactiae* foi recortada e transferida para 3mL de meio líquido, incubada por 72 horas e repicada para 30mL e posteriormente para 300mL e 3000mL, com intervalo de incubação de 96 horas a 37°C em microaerofilia. A determinação de unidades formadoras de colônia (ufc) 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 então centrifugado a 3.800g durante uma hora a 20°C e ressuspenso em PBS, pH 7,6; sendo esse processo repetido duas vezes. A viabilidade do *M. agalactiae* foi quantificada através da semeadura do material em Agar Hayflick modificado, nas condições descritas anteriormente. A concentração protéica dos antígenos foi determinada através do BioPhotometer plus Eppendorf, utilizando filtro de 280nm. O cultivo lavado foi armazenado a -20° C.

2.3 Formulação das Vacinas

A suspensão bacteriana obtida foi ajustada utilizando PBS, pH 7,6, para uma concentração protéica pré-inativação de 5mg/dose da vacina e inativada com formaldeído a 0,4% (v/v) por 24 horas a 37°C, sendo homogeneizada manualmente seis vezes durante o período de inativação. A suspensão inativada foi dividida em três alíquotas e em seguida adsorvidas sob agitação mecânica e constante durante três horas a temperatura ambiente, com o respectivo adjuvante:

a) Vacina 1: Gel de Hidróxido de Alumínio na concentração de 6mg/mL da vacina (adjuvante aquoso);

b) Vacina 2: Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic Inc.), na concentração de 25% (v/v) (adjuvante oleoso);

c) Vacina 3: Montanide Gel 01 PR (Seppic Inc.), a 5% (v/v) (adjuvante aquoso);

As vacinas foram estocadas a 4°C durante o período do experimento.

Foram realizados testes de inocuidade e esterilidade das vacinas produzidas. Para o teste de esterilidade 200µL de cada vacina foram semeados em Agar Hayflick modificado e incubado a 37°C em atmosfera de microaerofilia. Além disso, as amostras foram semeadas em Agar Sangue e Agar Sabouraud Cloranfenicol, com incubação a 37°C e 22°C, respectivamente, durante 21 dias. Ao final do período de incubação, as culturas foram examinadas macro e microscopicamente para observação da presença de micoplasmas ou outros microrganismos. A inocuidade das vacinas e dos placebos foi testada através da administração subcutânea de 2mL de cada vacina em um caprino (1 caprino/vacina ou placebo).

2.4 Seleção e acompanhamento do rebanho

Para formação dos grupos experimentais, foram selecionados caprinos e ovinos de rebanho sem histórico clínico de Agalaxia Contagiosa (AC) localizado no Assentamento Patativa do Assaré, Patos, PB. Este rebanho foi considerado o rebanho base para o desenvolvimento do experimento, recebendo acompanhamento médico veterinário 2-3 vezes por semana para orientação de medidas de controle higiênico-sanitário e nutricional.

Durante o período de acompanhamento, foram realizadas quatro coletas de sangue por sistema de coleta a vácuo, de todos os animais, com intervalo de três meses entre as coletas, para monitoramento de anticorpos anti-*M. agalactiae* através de um ELISA Indireto utilizando antígeno sonicado e conjugado de proteína G peroxidase (ELISA-Gs), como descrito por Campos et al. (2009).

2.5 Protocolo de imunização

Setenta e dois caprinos e 42 ovinos sem padrão racial definido, machos e fêmeas, com idade variando de 6 meses a 48 meses, foram distribuídos aleatoriamente e de forma homogênea em oito grupos formados por animais de ambos os sexos e de todas as idades: Gc1 (n= 23 caprinos) e Gov1 (13 ovinos) receberam a vacina 1; Gc2 (n= 22 caprinos) e Gov2 (12 ovinos) receberam a vacina 2; Gc3 (n= 22 caprinos) e Gov3 (12 ovinos) receberam a vacina 3 e, Gc4 (n= 5 caprinos) e Gov4 (n= 5 ovinos) foram utilizados como controle.

Duas doses de 2mL de cada vacina foram administradas por via subcutânea na região da axila previamente tricotomizada, com intervalo de 21 dias entre as doses. A primeira dose foi aplicada no lado direito do animal e a segunda dose no lado oposto. O grupo controle recebeu o mesmo protocolo de vacinação utilizando PBS estéril como inóculo.

No dia da primeira dose e a cada 15 dias a área da inoculação da vacina foi inspecionada e mensurada utilizando cutímetro digital para acompanhamento da reação vacinal.

2.6 Desafio

Para o desafio, quatro animais de cada grupo vacinado e dois do grupo controle, totalizando 14 caprinos e 14 ovinos, foram selecionados aleatoriamente e transferidos para aprisco no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, 65 dias após a segunda dose da vacina. O período de adaptação dos animais foi de 10 dias. O desafio experimental foi realizado através da administração de 5 mL de cultivo da amostra BrPB3.03 de *M. agalactiae* por via oral, numa concentração de 10^7 ufc/ml. Para as fêmeas em lactação foi acrescentado um

segundo protocolo de desafio, que consistiu na imersão dos tetos em solução contendo cultura bacteriana.

Os animais foram observados diariamente por dois meses, com exame clínico detalhado em dias alternados na primeira semana pós-desafio, com atenção especial para temperatura, linfonodos, glândula mamária, articulações e olhos, e coleta semanal de soro sanguíneo. Dos animais que apresentaram sinais clínicos foram coletadas amostras para cultivo bacteriano.

2.7 Sorologia

Para avaliar os níveis de anticorpos, amostras de sangue dos grupos vacinados foram coletadas de cada animal no dia da primeira vacinação (T0), 15 dias pós primeira vacinação (15 dpv), 21 dias pós primeira vacinação (21 dpv; dia da 2ª vacinação), e em seguida mensalmente durante cinco meses (51, 81, 111, 141, 171 dpv). Do grupo desafio foram realizadas coletas no dia do desafio (D0) e semanalmente durante 60 dias (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias pós desafio). Os soros foram armazenados a -20°C até o processamento.

Um ELISA Indireto (ELISA-Gs) foi empregado para detecção de anticorpos anti-*M. agalactiae*. O ponto de corte do teste (*cut-off*) é de 5,9% da média da densidade óptica (DO) do controle positivo (CP). O resultado de cada soro testado foi expresso como percentagem da DO média de três repetições do CP (CAMPOS et.al., 2009).

2.8 Análise estatística

Para análise estatística foi considerado o efeito do tratamento, o dia da observação e a interação entre os tratamentos, através do teste de Tukey, utilizando o software SAS.

3 Resultados e discussão

Sob o ponto de vista da esterilidade e da inocuidade, as vacinas se mostraram apropriadas, visto que não houve crescimento bacteriano nem fúngico no

teste *in vitro* e não induziram reações sistêmicas ou sinais clínicos de AC no teste *in vivo*.

Todos os animais vacinados apresentaram infartamento dos linfonodos pré-escapulares adjacentes ao local da inoculação, permanecendo assim até o sexto dia após as vacinações. Os animais do Gc2 e Gov2 apresentaram aumento da temperatura e dor no local da inoculação, que desapareceram por volta do quarto dia após a vacinação. Todos os animais vacinados apresentaram um nódulo no local da administração da vacina, com tamanhos e tempo de persistência variados como descritos na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as reações no local de vacinação ($p>0,05$). Não houve registros de abscessos ou outro tipo de reação indesejável durante todo período de observação. Aos 60 dias pós-vacinação o diâmetro do local da inoculação eram praticamente os mesmos do início da vacinação. Estudos realizados por Buonavoglia et al (2008) revelaram aumentos semelhantes aos observados nesse estudo, porém as reações persistiram por mais tempo.

Tabela 1. Tamanho da reação local (em mm) e persistência do nódulo (em dias) no local de inoculação de acordo com a vacina utilizada em caprinos (Gc) e ovinos (Gov).

Espécie/ vacina	Diâmetro da reação local de acordo com o período de observação (em dias)				
	0	15	30	45	60
Gc1	3,6*	13,0	8,3	6,2	3,7
Caprinos Gc2	4,1	12,2	7,6	4,2	4,5
Gc3	3,4	10,0	6,9	5,2	3,6
Gov1	3,1	10,6	6,2	5,3	3,8
Ovinos Gov2	3,8	14,4	4,9	4,4	4,2
Gov3	2,9	8,8	3,8	3,4	3,4

* Média dos valores expressos em mm. $p>0,05$

Nas Figuras 1 e 2 estão representados os níveis de produção de anticorpos desenvolvidos pelos animais durante o esquema de vacinação analisados pelo ELISA-Gs. É possível verificar um aumento progressivo após a primeira dose em todos os grupos vacinados, com níveis mais elevados 30 dias após a segunda dose

(51 dpv), evidenciando a necessidade da aplicação da segunda dose da vacina. Os animais do grupo controle permaneceram negativos durante todo período experimental.

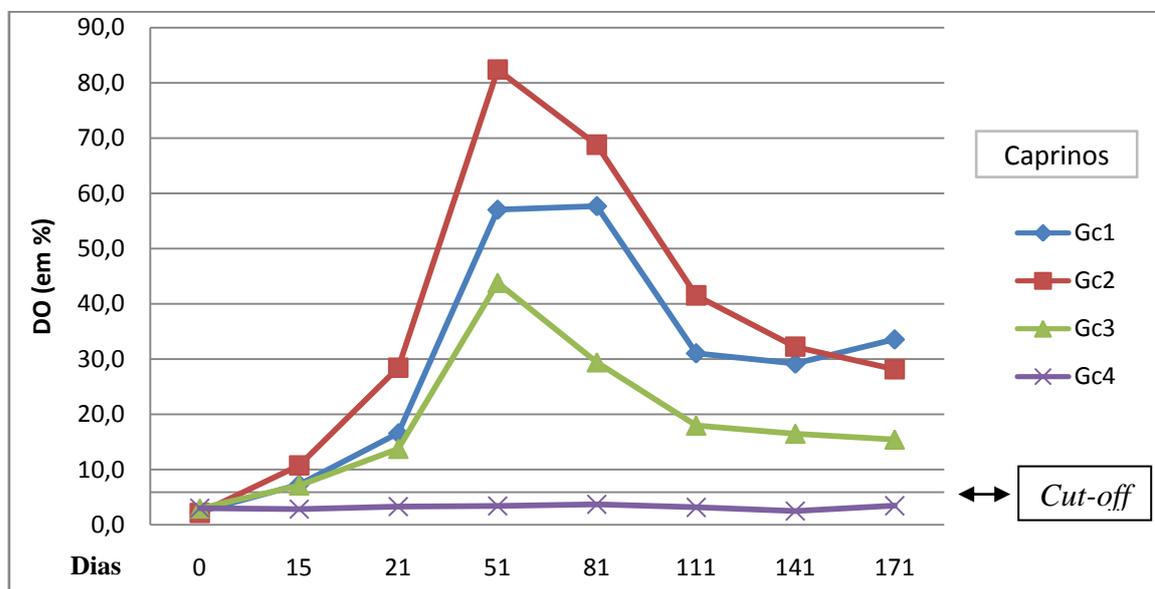


Figura 1. Níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* analisados pelo ELISA-Gs em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. Gc1 = caprinos imunizados com a vacina 1; Gc2 = caprinos imunizados com a vacina 2; Gc3 = caprinos imunizados com a vacina 3; Gc4 = caprinos não imunizados (controle).

0 = dia da 1ª dose; 15 = 15 dias após 1ª dose; 21 = dia da 2ª vacinação, 21 dias após 1ª dose; 51 a 171 = dias após a 1ª dose.

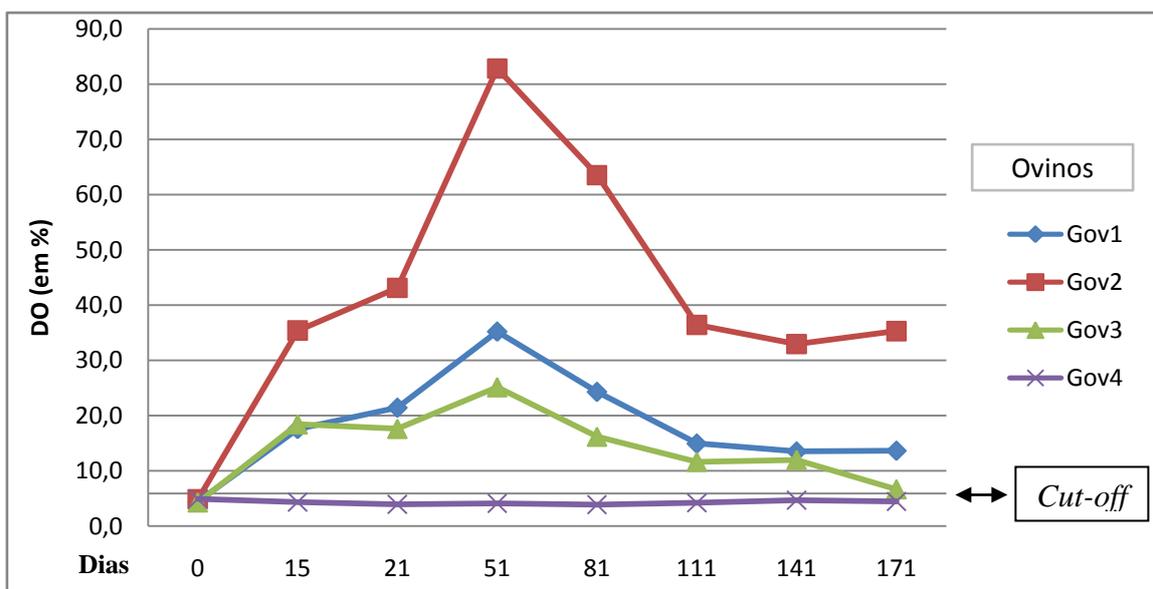


Figura 2. Níveis de anticorpos anti-*M. agalactiae* analisados pelo ELISA-Gs em ovinos vacinados contra agalaxia contagiosa. Gov1 = ovinos imunizados com a vacina 1; Gov2 = ovinos imunizados com a vacina 2; Gov3 = ovinos imunizados com a vacina 3; Gov4 = ovinos não imunizados (controle).

0 = dia da 1ª dose; 15 = 15 dias após 1ª dose; 21 = dia da 2ª vacinação (21 dias após 1ª dose); 51 a 171 = dias após a 1ª dose.

Pode-se observar que as três vacinas induziram produção de anticorpos, sendo que os grupos Gc1 e Gc2 foram semelhantes entre si e produziram níveis mais elevados e estatisticamente significativos em relação aos animais do grupo Gc3 e ao Gc4 ($p < 0,05$), quando analisadas pelo teste de Tukey (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de densidade óptica (DO) analisado através do ELISA-Gs dos caprinos vacinados (Gc1, Gc2, Gc3) e não vacinados (Gc4).

Dia	Percentual de Densidade Óptica (% DO) por grupo caprino após vacinação			
	Gc1	Gc2	Gc3	Gc4
0	2,4	2,2	3,0	3,0
15	7,3	10,8	7,1	2,8
21	16,6	28,4	13,8	3,3
51	57,0	82,4	43,8	3,5
81	57,7	68,8	29,4	3,7
111	31,1	41,5	18,0	3,2
141	29,2	32,2	16,5	2,5
171	33,6	28,2	15,5	3,5

Cut-off = 5,9%; $p < 0,05$

A resposta imunológica dos ovinos imunizados apresentou um comportamento diferente dos caprinos. Apenas os animais do grupo Gov2 apresentaram diferença estatisticamente significativa ao serem comparadas aos demais grupos vacinados e ao placebo ($p < 0,05$), quando analisadas pelo teste de Tukey (Tabela 3).

Resultados semelhantes aos relatados neste trabalho foram descritos por Alcântara (2010) e por Buonavoglia et al. (2010) quando utilizaram adjuvante oleoso na formulação da vacina. O Montanide IMS-2215-VG PR contém substâncias orgânicas imunoestimulantes em sua composição e provavelmente esta formulação estimulou resposta imunológica mais eficiente. Além disso, este adjuvante tem sido testado em suínos e camundongos, demonstrando capacidade de manutenção de títulos de anticorpos mais elevados que as vacinas que utilizam hidróxido de alumínio (Seppic, 1999).

Tabela 3. Percentual de densidade óptica (% DO) analisado através do ELISA-Gs dos ovinos vacinados (Gov1, Gov2, Gov3) e não vacinados (Gov4).

Dia	Percentual de Densidade Óptica (% DO) por grupo ovino após vacinação			
	Gov1	Gov2	Gov3	Gov4
0	4,5	4,9	4,3	4,9
15	17,6	35,4	18,5	4,4
21	21,5	43,1	17,6	4,0
51	35,2	82,8	25,2	4,1
81	24,3	63,5	16,2	3,9
111	15,0	36,5	11,7	4,2
141	13,5	33,0	12,0	4,7
171	13,7	35,3	6,7	4,5

Cut-off = 5,9%; $p < 0,05$

Embora os valores de Densidade Óptica tenham sido ligeiramente mais elevados nos caprinos que nos ovinos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas espécies (dados não apresentados). Entretanto essa pequena diferença pode estar relacionada com a origem da amostra utilizada para a produção da vacina, que foi isolada da espécie caprina. Sotoodehnia et al. (2005) observaram que ovinos apresentaram títulos mais elevados que caprinos quando imunizados com uma vacina de origem ovina.

Apesar dos animais do grupo Gc1 terem apresentado resultados mais baixos em termos de estimulação de anticorpos, ainda assim são maiores que os do Gc3 e do Gc4. Considerando o baixo custo do hidróxido de alumínio empregado como adjuvante na vacina 1 este produto pode representar uma opção para ser adotado em caprinos. Uma alternativa para aplicação em estudos futuros, seria incluir substâncias imunoestimulantes, como a saponina na composição da vacina (De LA FE et al., 2007) ou associar diferentes tipos de adjuvantes na mesma vacina.

Nessa perspectiva, Buonavoglia et al. (2008) analisaram uma vacina contendo três tipos de adjuvantes em diferentes concentrações e observaram que a vacina constituída por Montanide ISA-563, Marcol-52 e Montane-80 na proporção de 30:63:7, respectivamente apresentou os melhores resultados em termos de

produção de anticorpos. A desvantagem da vacina com tripla emulsão oleosa foi uma maior reação no local da inoculação, fato também observado no presente estudo e já comentado anteriormente.

Em relação à persistência de anticorpos, em outro estudo utilizando a vacina citada acima, Buonavoglia et al. (2010) constataram que os ovinos vacinados e desafiados aos 5 e 8 meses após o reforço vacinal não desenvolveram sinais clínicos de AC. No entanto, apresentaram declínio dos títulos de anticorpos mesmo após o desafio, ao contrário dos animais do grupo controle, que tiveram sinais clínicos e aumentaram os níveis de anticorpos.

Tola et al. (1999) ao utilizarem diversos tipos de substâncias inativantes em vacinas contra agalaxia contagiosa demonstraram que a saponina apresentou ótima capacidade de manutenção das proteínas imunogênicas do antígeno e manutenção de níveis de anticorpos por um período superior a seis meses.

As vacinas inativadas estimulam títulos de anticorpos mais baixos e menos persistentes, e devem ser repetidas em períodos mais curtos, de preferência antes e após o parto (LEON VIZCAINO et al., 1995). Provavelmente, este é um esquema vacinal que deverá ser adotado no Brasil, visto que em princípio, as vacinas a serem inicialmente empregadas serão inativadas, como as testadas neste estudo.

Após o desafio, os níveis os anticorpos dos caprinos vacinados apresentaram um rápido aumento nos grupos Gc2 e Gc3, ao contrário do grupo Gc1 que apresenta um declínio durante as semanas subseqüentes. Os animais do grupo controle só apresentaram níveis de anticorpos acima do ponto de corte a partir da terceira semana pós-infecção e mantiveram-se em crescimento até a sexta semana quando permanece estável, mas com tendência a redução. Todos os grupos iniciaram redução dos níveis de anticorpos a partir da quarta semana pós-desafio, contudo os grupos Gc2 e Gc3 mantiveram níveis bem acima do ponto de corte (Figura 3; Tabela 4).

O comportamento dos ovinos foi diferente dos caprinos. Apenas o Gov2 apresentou resposta após o desafio, atingindo o pico dos 14 aos 28 dias, quando iniciaram a redução na produção de anticorpos (Figura 4; Tabela 5). Estes resultados são semelhantes aos de Castro-Alonso et al. (2009) que analisaram a resposta imunológica de caprinos infectados experimentalmente por via intra-

mamária e constataram que os anticorpos anti-*M. agalactiae* estavam presentes a partir do 11º dia pós-infecção e persistiram até o 32º dia. Segundo Hasso & Al-Omran (1994), a via de inoculação pode interferir no tempo de produção de anticorpos contra *M. agalactiae*, sendo a intra-mamária a melhor via.

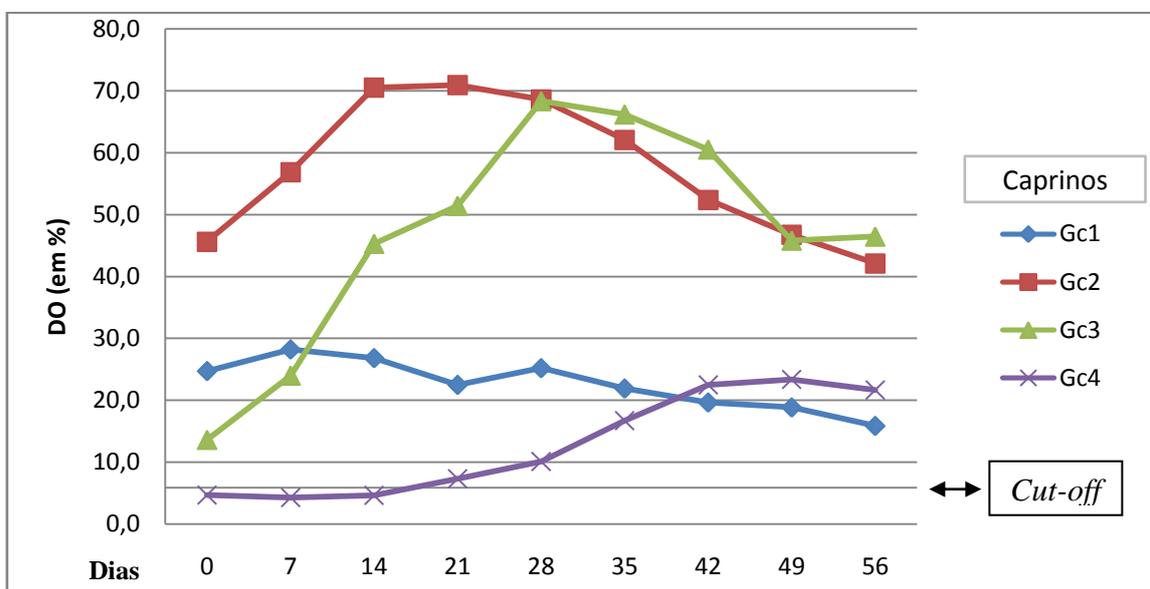


Figura 3. Comparação da resposta imune através do ELISA-Gs dos grupos de caprinos desafiados. Gc1 = caprinos imunizados com a vacina 1; Gc2 = caprinos imunizados com a vacina 2; Gc3 = caprinos imunizados com a vacina 3; Gc4 = caprinos não imunizados (controle).

D0= dia do desafio (75 dias após a segunda dose da vacina); D1 a D8 = data das coletas (em dias) após o desafio, realizadas com intervalo de 7 dias.

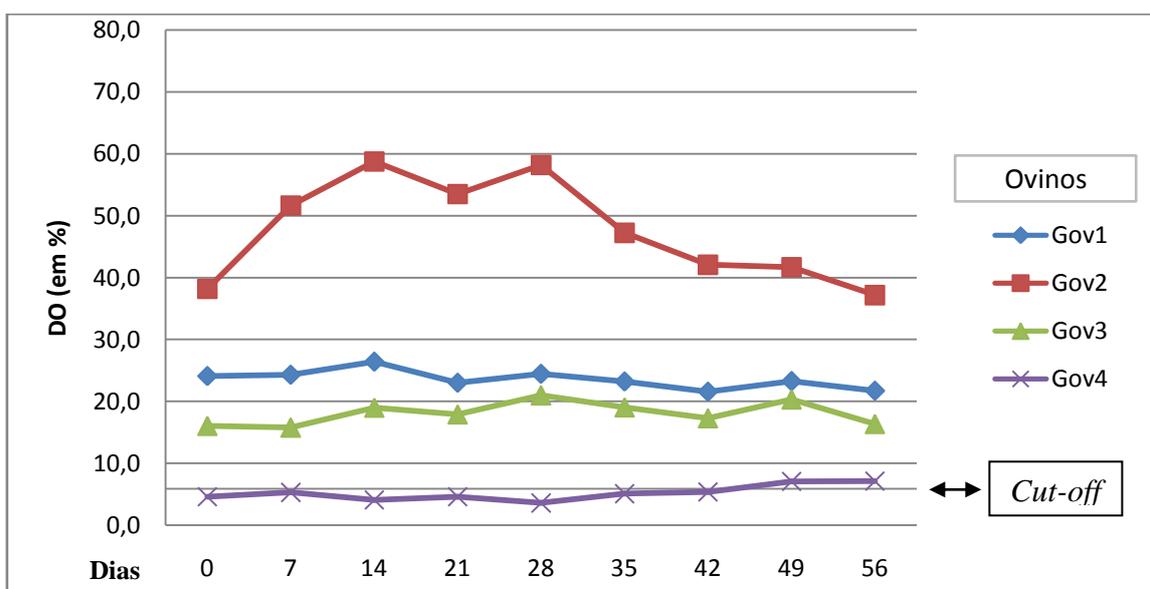


Figura 4. Comparação da resposta imune através do ELISA-Gs dos grupos de ovinos desafiados. Gov1 = ovinos imunizados com a vacina 1; Gov2 = ovinos imunizados com a vacina 2; Gov3 = ovinos imunizados com a vacina 3; Gov4 = ovinos não imunizados (controle).

D0= dia do desafio (75 dias após a segunda dose da vacina); D1 a D8 = datas das coletas (em dias) após o desafio, realizadas com intervalo de 7 dias.

Tabela 4. Resultados do ELISA-Gs em percentual de densidade óptica (% DO) após desafio dos caprinos. Grupos vacinados (Gc1, Gc2, Gc3) e não vacinado (Gc4).

Dias após o desafio	Percentual de Densidade Óptica (% DO) por grupo caprino após o desafio			
	Gc1	Gc2	Gc3	Gc4
0	24,7	45,6	13,7	4,7
7	28,2	56,9	24,0	4,3
14	26,8	70,5	45,3	4,6
21	22,5	70,9	51,5	7,3
28	25,2	68,6	68,4	10,1
35	21,9	62,1	66,2	16,7
42	19,7	52,4	60,5	22,5
49	18,9	46,7	45,8	23,4
56	15,9	42,1	46,5	21,7

Cut-off = 5,9%; $p < 0,05$

Tabela 5. Resultados do ELISA-Gs em percentual de densidade óptica (% DO) após desafio dos ovinos. Grupos vacinados (Gov1, Gov2, Gov3) e não vacinado (Gov4).

Dias após o desafio	Percentual de Densidade Óptica (% DO) por grupo ovino após o desafio			
	Gov1	Gov2	Gov3	Gov4
0	24,1	38,2	16,1	4,6
7	24,3	51,6	15,8	5,3
14	26,4	58,8	19,0	4,1
21	23,0	53,5	17,9	4,6
28	24,5	58,2	21,0	3,6
35	23,2	47,2	19,0	5,1
42	21,6	42,1	17,3	5,4
49	23,2	41,7	20,3	7,1
56	21,7	37,2	16,4	7,1

Cut-off = 5,9%; $p < 0,05$

Em nosso estudo, 16,7% (4/24) dos animais vacinados apresentaram discreta congestão dos vasos episclerais e da mucosa ocular, observados nas duas espécies

em diferentes períodos pós-desafio. Estes sinais foram observados em uma ovelha do Gov1 entre o 8º e 15º dia e em uma cabra do Gc1 entre o 8º e 54º dia pós-desafio. No grupo Gov2, uma ovelha apresentou os mesmos sinais do 42º ao 49º dia pós-desafio e no grupo Gov3 uma ovelha apresentou do 8º ao 15º dia. Os quatro animais do grupo controle desafiados apresentaram um ou mais dos seguintes sinais clínicos: aumento temporário dos linfonodos retrofaríngeos, submandibulares, pré-escapulares e supra-mamários, conjuntivite, estalos nas articulações dos membros torácicos, artrite e mastite. Os casos mais graves foram registrados em uma cabra, que apresentou mastite com redução da produção de leite 28 dias pós-desafio, e em uma ovelha, que apresentou artrite temporária. Foi possível o isolamento de *M. agalactiae* da secreção da glândula mamária de apenas dois animais, sendo uma cabra do grupo controle e que apresentou mastite e de uma cabra vacinada do Gc3. Neste animal, o isolamento foi obtido sete dias antes e sete dias após o parto.

Uma ovelha do Gov3, permaneceu com níveis de anticorpos baixos (2; 5; 7; 13 e 3% da média do controle positivo do ELISA-Gs) durante todo período experimental e mesmo após o desafio os títulos não aumentaram significativamente. Este animal apresentou lacrimejamento e congestão dos vasos episclerais, indicando uma provável incompetência ou resistência imunológica.

4 Conclusões

Os caprinos e ovinos imunizados com as vacinas 1 e 2 produziram anticorpos anti-*M. agalactiae* suficientes para preveniram o surgimento dos sinais clínicos da agalaxia contagiosa na maioria dos animais submetidos à infecção experimental;

Agradecimentos

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de

Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsas de estudos.

Referências Bibliográficas

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.

ALCÂNTARA, M.D.B. **Soroprevalência da agalaxia contagiosa e vacinação experimental em caprinos.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2010. 44p.

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.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; GRECO, M.F.; D'ABRAMO, M.; LATRONICO, F.; FASANELLA, A.; DECARO, N. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. **Res. Vet. Sci.**, v. 88, n. 1, p. 16-19, 2010.

BUONAVOGLIA, D.; FASANELLA, A.; SAGAZIO, P.; TEMPESTA, M.; IOVANE, G. BUONAVOGLIA, C. Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. **New Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. 209-212, 1998.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; QUARANTA, V.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiol.**, v. 31, p. 117-123, 2008.

CAMPOS A.C.; TELES J.A.A.; AZEVEDO E.O.; NASCIMENTO E.R.; OLIVEIRA, M.M.M.; NASCIMENTO S.A.; CASTRO R.S. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Rumin. Res.**, v. 84, p. 70-75, 2009.

CASTRO-ALONSO, A.; RODRÍGUEZ, F.; DE LA FÉ, C.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; POVEDA, J.B.; ANDRADA, M.; HERRÁEZ, P. Correlating the immune response with the clinical–pathological course of persistent mastitis experimentally induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, p. 274–280, 2009.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; RAMÍREZ, A.; POVEDA, J.B. Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: Humoral immune response in lactating goats. **Vet J.**, v. 174, n. 3, p. 610-615, 2007.

DOUTRE, M.; PERREAU, P.; NDIAYE, A.M. Un foyer d'agalaxie contagieuse de la chèvre à *Mycoplasma agalactiae* au Sénégal. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 34, n. 1, p. 11-14, 1981.

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.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAB, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats preliminary studies on vaccines. **J. Comp. Path.**, v. 80, p. 345-359, 1970.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAB, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats immunity of lactating ewes vaccinated before mating with live or dead vaccines. **J.Comp. Path.**, v. 81, p. 393-400, 1971.

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.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, D.; ALIBERTI, A.; FASANELLA, A. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 17-20, 2002.

HASSO, S. A.; AL-OMRAN, A. H. Antibody response patterns in goats experimentally infected with *Mycoplasma agalactiae*. **Small Rumin. Res.**, v.14, n. 1, p. 79-81, 1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEON VIZCAINO L.; GARRIDO ABELLAN, F.; CUBERO PABLO, M.J.; PERALES, A. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. **Vet. Rec.**, v. 137, n. 11, p. 266-269, 1995.

MARINHO, M.L. **Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos.** 2008. 118 p. (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2011. Disponível em: <http://web.oie.int/wahis/public.php>. Acesso em 05 de fevereiro de 2012.

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.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3.ed. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3., 2001.

SEPPIC. **Montanide® IMS.** Boletim Técnico P/1397/GB/01/SEP99. Disponível em: <http://www.seppic.com/animal-health/vaccine-adjuvant-@/1631/view-1111-category.html>, 1999.

SOTOODEHNIA, A.; MOAZENI JULA, G.; MADANI, R.; GOLCHINFAR, F.; NASERIRAD, A. Determination of Antibody Response against Inactivated Agalactia Vaccine in Small Ruminants. **Arch. Razi Ins.**, v. 60, p. 67-75, 2005.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, p. 45-50, 2001.

TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; ROCCHIGIANI, A. M.; IDINI, G.; ANGIOI, P. P.; LEORI, G. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 22, p. 2764-2768, 1999.