

ANA CLAUDIA CAMPOS

**ELISA PROTEÍNA-G PARA O DIAGNÓSTICO DE AGALAXIA CONTAGIOSA
DOS OVINOS E CAPRINOS.**

RECIFE

2008

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

ANA CLAUDIA CAMPOS

ELISA PROTEÍNA-G PARA O DIAGNÓSTICO DE AGALAXIA CONTAGIOSA
DOS OVINOS E CAPRINOS.

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

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro - UFRPE

Co-Orientador:

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo - UFCG

Recife

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

C198e Campos, Ana Claudia
Elisa proteína-G para o diagnóstico de agalaxia
contagiosa dos ovinos e caprinos/ Ana Claudia
Campos. -- 2008.
57 f.: il.

Orientador: Roberto Soares de Castro
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco -
Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.308 960 75

1. Caprino
 2. Ovino
 3. *Mycoplasma agalactiae*
 4. Sorologia
 5. Diagnóstico
 6. Micoplasmose
- I. Castro, Roberto Soares de
 - II. Título

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

ELISA PROTEÍNA-G PARA O DIAGNÓSTICO DE AGALAXIA CONTAGIOSA
DOS OVINOS E CAPRINOS.

Dissertação de Mestrado elaborada por:

ANA CLAUDIA CAMPOS

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Orientador - Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo

Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Departamento de Medicina Veterinária/ UFRPE

Aos meus pais Inácio e Ligia,
reflexos de amor, compreensão, esforço,
dedicação incondicional e lições suficientes
para me fazer uma pessoa de bem.
Amo vocês mais que tudo no mundo!!!!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Inácio e Ligia, por T-U-D-O, e ainda por suportarem todo o mau comportamento e ausência desses últimos tempos.

A minha querida irmãzinha Andrea Campos, por ser do jeitinho que ela é, agradeço **IMENSAMENTE**.

A Deus, por ainda acreditar que vou ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Roberto Castro, pelas oportunidades oferecidas, pelas lições de vida e por aqueles olhares de “Olha lá!”. Nem sei se mereço tanto!

A Oneide e Gabriel por dividirem o Prof conosco, mesmo durante as férias. Muitíssimo obrigada!!!!

Aos meus familiares e amigos pelo apoio em todos os momentos dessa louca vida.

A Edisio Oliveira de Azevedo, por me estimular e estar ao meu lado, mesmo com tanta distância, e por ter me confiado à realização desse sonho dele, que se tornou meu também. “Teremos coisas bonitas pra contar...”

Aos filhotes de Edisio, Lucas e Camila por não terem gostado da idéia do mestrado, mas que sem saber, me ajudaram muito. Vocês contribuem muito para a minha felicidade!

A Belinha e Ópero Jr pelo barulho e bagunça que fizeram durante a concepção dessa Dissertação. Especialmente a Belinha que conseguiu evoluir de carnívora a herbívora pelos estímulos de Ópero Jr, parabéns!

A Cuíca, Francisca e Tereza, pelo carinho e presença constante.

A Aristarco que nunca acreditou que eu estava em Patos trabalhando na minha dissertação e que forneceu dicas fantásticas para esse trabalho. P.S. O gato não flutuou!!

A Aderaldo, Adrianinha e Caio pelos momentos de descontração quando o desespero tomava conta dos meus pensamentos.

A Sergio Alves, meu querido AMIGO, com quem dividi inquietações muitas vezes angustiantes. Obrigada pelas palavras de apoio e esclarecimentos.

A Inês, pelos momentos tranquilos, divertidos e construtivos. Sem ela nossas pesquisas estariam muiiiito atrasadas.

A menina Michele Moreira Martins de Oliveira, pelas conversas amigas, pela divisão do conhecimento, e por ser a madrinha de uma das melhores coisas que aconteceu na minha vida.

Aos amigos de laboratório e de pós-graduação Pedro Moura Sobrinho e Rosana Léo por não deixarem a correria anular os ótimos momentos que tivemos.

A Andreey Teles, aluno de Veterinária da UFCG, pelo apoio e trabalho em conjunto do início até o fim dessa dissertação.

A Sheila Gomes por achar que sou uma pessoa de bem, e pelos ótimos momentos de convivência na Rural.

As recém chegadas no laboratório de Virose/UFRPE Camila e Salomé.

A Márcio Sampaio, criador de cabras leiteiras em Cabaceiras/PB, pela colaboração em nosso trabalho.

Aos caprinos, doadores de material para a execução desse trabalho. Que os resultados beneficiem e aumentem a qualidade sanitária da criação de caprinos no Nordeste brasileiro.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE Leonildo Bento Galiza da Silva e Rinaldo Aparecido Mota, pelas valorosas contribuições após análise do nosso trabalho.

A UFCG/ Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, pelo apoio oferecido durante o experimento.

Aos professores da UFCG/CSTR, Campus Patos, Graça Xavier, Patrícia Brandão e Carlos Peña, pelo apoio durante as atividades.

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

As novas amigas Dayse Vasconcelos e Rafaella Villaça, que quebraram a cabeça junto comigo durante as tentativas desse experimento ser um pouco maior. Obrigada pela atenção, apoio e momentos de descontração.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos nos últimos 12 meses de atividades.

Aos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Ah! Eu devia estar sorrindo e orgulhoso por ter finalmente vencido na vida
Mas eu acho isso uma grande piada e um tanto quanto perigosa...

...É você olhar no espelho se sentir um grandessíssimo idiota saber que é
humano, ridículo, limitado que só usa dez por cento de sua cabeça animal

E você ainda acredita que é um doutor, padre ou policial

Que está contribuindo com sua parte para nosso belo quadro social...

...Eu devia estar contente por ter conseguido tudo o que eu quis, mas confesso
abestalhado que eu estou decepcionado

Porque foi tão “fácil” conseguir e agora eu me pergunto: E daí?

Eu tenho uma porção de coisas grandes pra conquistar, e eu não posso ficar aí parado...”

Raul Seixas

RESUMO

A Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC) é uma enfermidade caracterizada clinicamente por mastite, agalaxia, artrite e ceratoconjuntivite, determinando grandes perdas econômicas em rebanhos ovinos e caprinos leiteiros. O diagnóstico clássico é feito pelo cultivo e isolamento dos micoplasmas envolvidos. A utilização dessa técnica como único método diagnóstico, contribui para a disseminação da infecção e dificulta a implantação de medidas eficazes de controle por requerer longo tempo para conclusão diagnóstica. Por isso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto utilizando a proteína G (ELISA-G) como conjugado e aplicação de dois tipos de antígenos produzidos a partir de *M. agalactiae*. Antígeno total e sonicado foram utilizados para sensibilizar as microplacas. A padronização da técnica foi realizada utilizando soros caprinos com e sem sinais clínicos de agalaxia contagiosa. Quarenta e seis soros caprinos coletados com intervalo de 45 dias, obtidos em rebanho infectado com sinais clínicos e 40 soros caprinos de rebanhos livres da infecção foram utilizados para avaliação da técnica. A presença de *M. agalactiae* no rebanho foi confirmada por cultivo de leite em meio Hayflick modificado. Não houve diferença significativa entre os valores da razão positivo/negativo (P/N) dos soros controles quando utilizado antígeno total ou sonicado. A sensibilidade relativa do ELISA-Gt e ELISA-Gs foi de 77,27% e 88,63%, respectivamente, enquanto que a especificidade foi de 95,24% para ambos. Pesquisa de anticorpos em rebanho com quadro clínico característico revelou aumento significativo dos percentuais de densidade óptica (DO) em soros caprinos, coletados com intervalo de 45 dias. Conclui-se que os ELISA podem ser úteis para identificação de rebanhos infectados por agalaxia contagiosa de pequenos ruminantes, com uma relativa vantagem para o ELISA-Gs.

Palavras-chave: caprino, *Mycoplasma agalactiae*, sorologia, diagnóstico.

ABSTRACT

The contagious agalactia of ovine and caprine (CAOC) is characterized by a decline and subsequent failure of milk production, arthritis and keratoconjunctivitis causing economic losses in dairy goats and sheep herds. Classic diagnostic is performed by culture and identification of mycoplasmas species. The utilization only of this method to diagnostic has contribute for dissemination of infection and reduced efficiency of the controls measures because your necessity of long time to the diagnostic conclusion. The objective this study was performed and standardized an indirect ELISA using conjugate with protein-G (ELISA-G) and two types of obtained by growth of *M. agalactiae* antigen. Whole bacterial and sonicated culture was used as antigen to sensibility on microtitre plates. A total of 46 serum sample were obtained in infected goat herd with clinical signs in forty-five period and 40 samples in free herds of disease to standardization and application of ELISA test. The infection status was confirmed by culture of *M. agalactiae* from milk. Do not had statistical difference between positive and negative controls serum (P/N) when whole or sonicated antigen were used. The sensibility of ELISA-Gt and ELISA-Gs were of 77,27% and 88,63%, respectively. Specificity were 95,24% for both ELISA. In conclusions, the indirect ELISA-Gt or ELISA-Gs should be utilized as tools for diagnostic of contagious agalactia in goats.

Keywords: caprine, *Mycoplasma agalactiae*, sorology, diagnostic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
FIGURA 1	Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gt, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.	51
FIGURA 2	Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gs, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.	51

LISTA DE TABELAS

		Pág.
TABELA 1	Titulação do antígeno total e sonicado frente a soro caprino diluído 1:50 utilizando ELISA-G.	48
TABELA 2	Titulação do antígeno total e sonicado frente a soro caprino diluído 1:100 utilizando ELISA-G.	48
TABELA 3	Resultados percentuais das DO dos soros de coelhos hiperimunizados contra <i>Mycoplasma</i> spp.	48
TABELA 4	Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de <i>M. agalactiae</i> .	49
TABELA 5	Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de <i>M. agalactiae</i> .	49
TABELA 6	Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de <i>M. agalactiae</i> de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.	50
TABELA 7	Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de <i>M. agalactiae</i> de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.	50

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3 AGALAXIA CONTAGIOSA DOS OVINOS E CAPRINOS: REVISÃO E SITUAÇÃO NO BRASIL	17
3.1 Histórico	17
3.2 Agentes etiológicos envolvidos na ACOC	17
3.3 Patogenia	18
3.4 Epidemiologia	19
3.5 Importância econômica	20
3.6 Aspectos clínicos e patológicos	21
3.7 Diagnóstico	23
3.8 Medidas de controle e prevenção	26
3.9 Situação no Brasil	28
3.10 Referências	32
4 ARTIGO CIENTÍFICO	42

Padronização de um ELISA proteína-G indireto para o diagnóstico de agalaxia contagiosa em caprinos.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura brasileira tem apresentado nos últimos anos um expressivo crescimento em termos de quantidade e qualidade dos rebanhos. A região Nordeste destaca-se por apresentar aproximadamente 92% dos 10,4 milhões de caprinos do Brasil (IBGE, 2006). Em que pese a importância da quantidade de animais, é na qualidade dos rebanhos que a região Nordeste vem demonstrando seu verdadeiro potencial como fornecedora de material genético para outras regiões do país.

O melhoramento genético das raças naturalizadas para aptidões específicas (leite, carne ou pele) associado ao aumento expressivo de consumo de produtos do setor, denota a importância econômica da caprinocultura como um dos pilares de sustentação das famílias no semi-árido. O programa do leite, promovido pelos governos estaduais e federal tem estimulado fortemente a adesão de produtores à atividade, transformando a realidade local. Muitas famílias aderiram ao programa e estão conseguindo trazer seus filhos de volta para zona rural, sobretudo para atuarem na produção de leite caprino.

A despeito dessa realidade, problemas sanitários e de ordem zootécnica ainda são comuns nas criações de pequenos ruminantes no Nordeste. As perdas advindas de morte por falta de higienização, deficiência de manejo nutricional, doenças infecciosas e parasitárias constituem os principais entraves para o aumento nos índices de produtividade. Acrescente-se a isso, a falta de tecnologias apropriadas para a região, em termos de beneficiamento e industrialização de produtos derivados, bem como a inexistência de técnicas diagnósticas que permitam a identificação dos principais microrganismos ou detecte a presença de anticorpos nos animais.

Exemplo disso é a agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC), doença exótica até 2002 no país, mas que vem se disseminando rapidamente nos estados nordestinos por falta de políticas adequadas para o desenvolvimento de produtos e processos que reduzam os efeitos da enfermidade. A produção de vacinas para ACOC é uma ferramenta que poderá auxiliar no controle da doença.

No entanto, antes disso, é preciso identificar os locais em que a doença está presente e adotar medidas para evitar sua disseminação. O desenvolvimento de métodos diagnósticos aplicáveis a situações de risco (exposições, feiras, leilões) devem ser estimulados como forma de

contribuir para a redução dos casos de ACOC, melhorando a qualidade sanitária dos rebanhos e conseqüentemente, fortalecimento da cadeia produtiva.

Neste sentido, este trabalho objetiva padronizar um ensaio imunoenzimático para diagnóstico sorológico da doença em pequenos ruminantes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver e padronizar um ELISA indireto com proteína-G para o diagnóstico sorológico da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos.

2.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Produzir Antígeno a partir do isolamento de *Mycoplasma agalactiae* de animais naturalmente infectados.

3.2.2 Estabelecer um método simplificado de obtenção do Antígeno de *M. agalactiae* para ser empregado no ELISA-G.

3.2.3 Padronizar as condições de uso do ELISA-G;

3.2.4 Determinar a sensibilidade e a especificidade relativa do teste.

3 AGALAXIA CONTAGIOSA DOS OVINOS E CAPRINOS: REVISÃO E SITUAÇÃO NO BRASIL

3.1 HISTÓRICO

A agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) é uma das principais micoplasmoses dos pequenos ruminantes e foi descrita pela primeira vez há aproximadamente dois séculos. Segundo Zavagli (1951), na sua forma clínica a doença foi primeiramente descrita por Metaxa no ano de 1816, na Itália, e o nome agalaxia contagiosa foi proposto por Brusasco em 1871. Só no ano de 1925, Bridé e Donatien conseguiram cultivar um microrganismo hoje conhecido como *Mycoplasma agalactiae* de ovelhas afetadas por uma agalaxia contagiosa. Oficialmente ACOC ocorre em todos os continentes, sendo endêmica nos países da costa do Mar Mediterrâneo (DaMASSA et al., 1992; FLEURY et al., 2001; MADANAT et al., 2001; OIE, 2008).

As micoplasmoses constituem um complexo de enfermidades de distribuição cosmopolita que acometem várias espécies de mamíferos e aves. Os caprinos e ovinos podem ser infectados por várias espécies de micoplasmas, recebendo denominações diferentes de acordo com o(s) agente(s) envolvidos na infecção. Por exemplo, a pleuropneumonia contagiosa dos caprinos tem como agente o *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae*; a ceratoconjuntivite infecciosa é causada por *M. conjunctivae* e por *M. agalactiae*; casos de pneumonia podem estar relacionados com *M. mycoides* subesp. *capri*, *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* (NASCIMENTO et al., 1986; FASANYA et al., 1987; CASTRO et al., 1989; ORÓS et al., 1997; DE la FE et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; DE la FE et al., 2007). *M. arginini* e *M. mycoides* subesp. *mycoides* e *M. mycoides* subesp. *capri* foram isolados do conduto auditivo externo de caprinos saudáveis (RIBEIRO et al., 1997).

3.2 AGENTES ETIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA ACOG

O principal agente responsável pela ACOG é *M. agalactiae*. No entanto, outras espécies estão relacionadas com a doença, determinando diferentes graus de gravidade da infecção. Associações com dois ou mais agentes tem sido identificadas em alguns países, como: *M. mycoides* subesp. *mycoides* LC (Large Colony), *M. agalactiae* e *M. arginini* (DE la FE et al., 2005), *M. agalactiae* e *M. putrefaciens* (GIL et al., 2003). Recentemente, Vilei et al., (2006) propôs a junção de *M. mycoides* subesp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subesp. *capri* em uma única sub-espécie, por sua similaridade genotípica.

O primeiro isolamento de *Mycoplasma agalactiae* foi realizado por Bridé e Donatien em 1923, sendo denominada de *Anulomyces agalaxie* por Wroblewski. Em 1957, Freundt baseado nas novas normas de taxonomia, propôs *M. agalactiae*. Trata-se de uma bactéria pleomórfica que mede entre 124 e 250 nm, possui DNA circular com aproximadamente 877 kb (gi:148291314). Possui membrana plasmática, ribossomos e a molécula de DNA altamente condensada (RAZIN, 1999). São resistentes à penicilina e seus análogos por não possuírem parede celular, mas é sensível aos choques osmóticos e aos efeitos de detergentes. Multiplica-se por divisão binária, é Gram-negativa e cresce em meio líquido e sólido contendo esteróis. O crescimento é promovido sob condições de aerobiose ou microaerofilia a uma temperatura média de 37°C (WHITFORD et al., 1994).

M. agalactiae não fermenta glicose, não hidrolisa arginina nem uréia, mas requer umidade atmosférica com 5% de CO₂ produzindo filmes e manchas em meio sólido. As colônias têm aparência típica de ovo frito ou mamilar. Até a década de 1970, *M. agalactiae* foi considerada uma espécie antígenicamente uniforme, mas estudos mais recentes demonstram sua heterogeneidade antigênica (SOLSONA et al., 1996; TOLA et al., 1996; KÖNIGSSON et al., 2002). *M. agalactiae* é sensível ao aumento da temperatura, sendo inativada a 60°C durante cinco minutos e a 100°C em um minuto; na temperatura de 8°C sobrevive mais de quatro meses, e durante uma ou duas semanas em temperatura ambiente; a -20°C permanece viável por oito a nove meses. Há registro de crescimento bacteriano obtido de leite armazenado por cinco anos a -20°C (AZEVEDO, comunicação pessoal, 2008). *M. agalactiae* é inativado pela radiação ultravioleta, putrefação e ação de desinfetantes comuns concentrados, como cloramina, hidrocloreto de potássio e formalina (BERGONIER et al., 1997).

3.3 PATOGENIA

M. agalactiae infecta o hospedeiro principalmente por via oral e intra-mamária, e, menos freqüentemente, 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 seguida de febre e distribuição do agente nos órgãos alvos (glândula mamária, olhos, órgãos internos, linfonodos, articulações, tendões, etc), onde ocorre o processo inflamatório. *M. agalactiae* não produz toxinas e o mecanismo pelo qual a lesão se processa ainda não está esclarecido. Animais

gestantes podem abortar ou produzir crias inviáveis em consequência da inflamação do útero (MADANAT et al., 2001).

3.4 EPIDEMIOLOGIA

A enfermidade é transmitida muito rapidamente através do contato com animais infectados, com ou sem sinais clínicos, ou através da ingestão de água e alimentos contaminados com exsudatos e pelo leite. A excreção de microrganismos pode continuar durante vários meses no leite, urina, fezes, exsudatos nasais e oculares. As fêmeas em lactação adquirem a infecção via galactófora ascendente ou através das mãos do ordenhador ou da ordenhadeira mecânica, ou ainda através do contato com materiais contaminados, tipo: cama, solo, etc. A inalação também pode ser via de infecção. Venda de animais portadores e o contato entre os animais durante a transferência constitui os principais meios de transmissão entre rebanhos. Nos rebanhos endêmicos a doença ocorre frequentemente próximo ou durante a lactação, por vários anos seguidos (BERGONIER et al., 1997; MADANAT et al., 2001).

Uma característica da infecção por *M. agalactiae* é sua capacidade de persistir no organismo mesmo após elaboração de resposta imunológica. Isto decorre da particular habilidade da bactéria de modificar a camada superficial de sua membrana plasmática conseqüente à alta frequência de variação dos componentes de sua superfície, particularmente lipoproteínas. Nos últimos anos vários estudos têm mostrado que a despeito do pequeno genoma, os micoplasmas são repletos de sistemas básicos de mutação que promovem variações na expressão e estrutura de genes específicos, como uma estratégia para sua sobrevivência (RAZIN, 1999). Este é, até o presente momento, um dos poucos mecanismos conhecido envolvendo sua patogenicidade. A lise celular por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) produzido pelos micoplasmas pode ser um importante mecanismo de patogenicidade. Khan et al., (2005) demonstraram a capacidade de alguns isolados de *M. agalactiae* e *M. bovis* produzirem H₂O₂, a partir da oxidação de ácidos orgânicos presentes no meio de cultura. As amostras tinham sido isoladas de surtos de agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos e de pneumonia em bezerros, respectivamente.

A doença persiste no rebanho, em virtude do agente continuar sendo excretado, por longos períodos, quando os sinais clínicos já não estão presentes. 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 portador interessante 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. Normalmente, rebanhos que apresentaram surtos permanecem sem expressão clínica por um período, em virtude da imunidade naturalmente adquirida pela infecção. Até o momento não está estabelecido quanto tempo a imunidade persiste nos animais naturalmente infectados. Os animais permanecem com o agente infeccioso em seus órgãos genitais, sendo a condição de portador menos óbvio em machos do que em fêmeas caprinas. No entanto, micoplasmas podem ser isolados do canal auditivo externo de animais clinicamente saudáveis e doentes (COTTEW e YEATS, 1982; RIBEIRO et al., 1997; GIL et al., 1999). A sobrevivência do microrganismo no meio ambiente é importante para a disseminação da enfermidade e os pequenos ruminantes são os únicos hospedeiros sensíveis atuando como reservatório (BERGONIER et al., 1997; CORRALES et al., 2007).

3.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Agalaxia contagiosa é uma das principais micoplasmoses de cabras e ovelhas na Europa, principalmente na Grécia, França, Itália, Portugal e Espanha. Neste continente, estima-se em mais de 30 milhões de dólares as perdas anuais advindas da enfermidade, pela redução da produção de leite, morte de animais e abortos (NICHOLAS, 2002). Resulta em significativas perdas no continente Africano, bem como, em países como Índia, Israel, Iran, Jordania e Estados Unidos. No Iran, 3152 surtos foram notificados entre 2005 e 2007 (OIE, 2008). A doença vem sendo relatada no Japão desde o ano de 2006 (OIE, 2008). 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 et al., 2008). 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, 2004).

Nos EUA, Kinde et al. (1994) descreveram um surto de ACOC causada por *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* que resultou na morte de 90 (15%) das 600 cabras do rebanho, determinando perdas pela morte dos animais, redução da produção e necessidade de adotar medidas de controle, como intensificação da higienização da plataforma de ordenha.

Na Espanha, Gil et al. (2003) descreveram um surto em rebanho constituído por 100 animais adultos (95 fêmeas e cinco machos) e 60 jovens. No período de duas semanas, 84% das fêmeas apresentaram sinais clínicos (mastite aguda, agalaxia, artrite ou poliartrite e ceratoconjuntivite), sendo que 48% morreram; outras 32 cabras foram sacrificadas por apresentarem quadro clínico extremo. Entre os cabritos, o sinal clínico predominante foi poliartrite e prostração e a taxa de mortalidade foi de 82%.

3.6 ASPECTOS CLÍNICOS e PATOLÓGICOS

Os casos clínicos ocorrem com maior frequência 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 ACOC 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. No início o úbere é quente, edemaciado e dolorido, tornando-se flácido com bastante tecido conectivo e eventualmente atrofiado. A coloração do leite pode variar desde claro (aquoso) a amarronzado com grumos ou apresentar-se com aspecto purulento, impróprio para o consumo e inadequado para a indústria de laticínios. 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). Associado ou não, os animais podem desenvolver pleurite, pericardite, peritonite, meningite serosa e/ou fibrinosa e uma artrite com exsudato fibrino-purulento (NASCIMENTO et al., 1986; SMITH e SHERMAN, 1994; RUFFIN, 2001; TABOSA et al., 2002). Casos clínicos de agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes são responsáveis pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite (CORRALES et al., 2004). Microscopicamente, a glândula mamária revela um infiltrado inflamatório mononuclear envolvendo os ácinos e ductos (AZEVEDO et al., 2006).

Casos de mastite crônica, septicemia, artrite, cerato-conjuntivite e pneumonia foram relatadas por Real et al. (1994) em caprinos infectados por *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. mycoides* subsp. *capri*. Gil et al. (2003) relatam à ocorrência de salpingites descamativa, metrite catarral cística e degeneração testicular em caprinos com ACOC de um rebanho comercial na região de Extremadura, sudeste da Espanha. Apesar de *M. agalactiae* e *M.*

putrefaciens terem sido isoladas de vários órgãos, apenas *M. putrefaciens* foi isolada de lesões genitais.

Não há predisposição por idade e o quadro de poliartrite é mais comum nas articulações do carpo e tarso, que apresentam-se doloridas, contendo líquido de aspecto fibrino-purulento, podendo variar de transparente a amarelado (DaMASSA et al., 1984). A punção do líquido reduz a pressão da cápsula articular, produzindo uma sensação de alívio ao animal. Poliartrite determina perda de peso acentuada, podendo levar o animal à morte por inanição, devido à incapacidade de locomoção (AZEVEDO, 2005). Nos casos crônicos pode-se 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 e 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).

Dependendo do agente predominante, pode haver variação na apresentação clínica. *M. capricolum* subsp. *capricolum* infecta mais freqüentemente caprinos que ovinos e a doença manifesta-se por febre, septicemia, mastite e severa artrite. Exames post-mortem revelam sinais de pneumonia. Quando *M. putrefaciens* é o responsável pela infecção observa-se mastite, agalaxia, artrites e abortos, porém não há lesões oculares (ADLER et al., 1980; BERGONIER et al., 1997).

Na quadro septicêmico, as lesões de infarto renal, necrose focal esplênica com depleção da polpa branca e linfadenite estão presentes. A cápsula articular apresenta exsudado fibrino-purulento com áreas de necrose, edema e numerosos microabscessos, podendo-se observar ainda vasculites e trombozes com infiltrados perivascularares de macrófagos (SMITH e SHERMAN, 1994; TABOSA et al., 2002; CORRALES et al., 2004).

Inoculação experimental com *M. agalactiae* na mucosa vulvar de cabras resultou em vulvovaginite granular em 25 dos 30 animais infectados. As lesões microscópicas, a partir do sétimo dia pós-infecção, caracterizaram-se por edema do estroma, infiltração linfocítica na lâmina própria e acúmulo perivascular de linfócitos. As lesões observadas entre 28 e 49 dias foram comparáveis aos casos espontâneos graves. As alterações presentes dos 56 aos 70 dias foram sugestivas de estágio crônico da doença. *M. agalactiae* foi re-isolado de todos os animais infectados do 7º ao 70º dia pós-infecção (SINGH et al., 1975). Contrastando esses resultados, MacOwan et al. (1984) não conseguiram reproduzir doença grave em ovinos inoculados com *M. agalactiae*. Apenas um animal desenvolveu rápida laminite e artrite e

outro apresentou lacrimejamento, embora tenha sido possível o re-isolamento do microrganismo durante sete meses desses dois animais.

A inoculação de diferentes amostras de *M. agalactiae* por via intra-mamária em ovelhas confirmaram a disseminação da infecção para o lado oposto da glândula mamária. A infecção persistiu durante todo período experimental (sete semanas). A avaliação sorológica por ELISA demonstrou que não houve diferença entre a virulência da amostra, severidade dos sinais clínicos e títulos de anticorpos detectados entre os grupos estudados. A excreção de *M. agalactiae* atingiu níveis que variaram de 10^2 a 10^{12} ufc/ml de leite nas duas primeiras semanas, decrescendo para 10^2 a 10^3 ufc/ml de leite no decorrer do período experimental. Estes resultados indicam que rebanhos sem sinais clínicos, mas com presença de *M. agalactiae* no leite devem permanecer em estrito controle, uma vez que a infecção pode recidivar quando as condições de manejo forem alteradas (SANCHIS et al. 2000).

3.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo da ACOC é estabelecido com base nos achados epidemiológicos e na presença de sinais clínicos. Isto é relativamente factível, quando os sinais clínicos são observados no rebanho, isto é, redução da produção de leite, agalaxia, mastite, ceratoconjuntivite e artrites. 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 pelo cultivo em meios específicos, contendo soro animal (coelho, equídeo ou suíno), como fonte de esteróis. Diversos espécimens podem ser utilizados, 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).

Durante o exame post-mortem, poderão ser coletadas amostras da glândula mamária, dos linfonodos regionais, das lesões pulmonares e dos líquidos articulares. Micoplasmas também podem ser isoladas de órgãos, porém estas amostras devem ser coletadas na fase de bacteremia. Também se pode fazer suabes retais e do canal auditivo externo que também fornecem material biológico adequado para exame (DaMASSA, 1983; RIBEIRO et al., 1997).

A utilização de solução salina glicerinada a 50% ou meio de transporte específico, contendo antibióticos (penicilinas) preserva os micoplasmas e inibem eventuais

contaminantes. Para estudos histopatológicos tradicionais, fragmentos de órgãos podem ser coletados e fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% ou para estudos de imunohistoquímica (RODRIGUEZ et al., 2002).

Os meios de cultura devem conter fatores de crescimento, vitaminas e precursores de DNA, enriquecidos com soro equino, suíno ou coelho para suprirem a necessidade de colesterol que a maioria dos micoplasmas exigem. Meios seletivos (caldo e Agar PPLO, Hayflick, SP4 e outros) contendo penicilina e acetato de tálio são os mais freqüentemente utilizados (WHITEFORD et al., 1994; RODRIGUEZ et al. 2002).

O material para cultivo deve ser diluído em meio líquido e semeado em placas, incubados a 37°C, em microaerofilia, durante 14-21 dias. Material muito contaminado deve ser filtrado em membranas de 0,3 – 0,45 µm antes da semeadura. Em meio sólido *M. agalactiae* forma colônias com aspecto de “ovo frito”, produz filmes e manchas. Na primeira semeadura em meio é comum observar colônias arredondadas, pequenas e transparentes, com aspecto de gotas de chuva e nos repiques subseqüentes apresentarem-se em forma de “ovo frito” (AZEVEDO et al., 2006). O uso de testes bioquímicos para sua identificação deve ser empregado, mas demanda tempo e nem sempre é de fácil interpretação.

Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas têm sido padronizadas na perspectiva de reduzir o período necessário para o diagnóstico final. Assim, Tessler (1973) e Kinde et al. (1994) desenvolveram a reação de imunofluorescência para identificação de antígenos em cultivos laboratoriais. 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; RODRIGUEZ et al., 1997; GRECO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006;). Fleury et al. (2001) identificaram uma proteína de 30 kd em 20 das 27 amostras de *M. agalactiae* de campo, usando PCR e *southern-blot*. No entanto, estas técnicas são de difícil aplicação na rotina laboratorial, por exigir reagentes de alto custo, equipamentos sofisticados e mão-de-obra qualificada.

Para amenizar esta situação, métodos de identificação têm sido desenvolvidos. Os primeiros ensaios aplicados foram os testes de inibição do crescimento, utilizando discos de papel impregnados com soros hiperimunes sobre as colônias de micoplasmas em placas de Agar (CLYDE, 1964). Kinde et al. (1994) adaptaram a técnica de inibição de crescimento em agar ao invés de discos impregnados com anti-soro. São estes avanços que permitem maior

segurança na identificação de animais infectados e conseqüentemente, maior aplicabilidade das técnicas diagnósticas.

Apesar desses avanços, eventualmente, há necessidade de comprovação por meio de técnicas mais específicas, em virtude de reações cruzadas entre amostras estreitamente relacionadas como, por exemplo, as do grupo *M. mycoides* ou mesmo por variações no tamanho e expressão antigênica das proteínas de superfície da amostra, resultante de passagens sucessivas em laboratório, podendo levar a diagnóstico incorreto (ROSENGARTEN e YOGEV, 1996). Outra desvantagem dos métodos sorológicos é a necessidade de diferentes tipos de soros para se estabelecer a comparação frente ao antígeno que se deseja identificar, o que dificulta seu emprego na rotina diagnóstica.

A qualidade e pureza dos antígenos e a semelhança antigênica das amostras resultam em reações cruzadas, influenciando a sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos. Uma das alternativas mais simples para solucionar este evento é a separação de proteínas específicas para cada microrganismo, por meio de sonicação, eletroforese, digestão enzimática, entre outras (LAMBERT et al., 1989; BELLOY et al., 2001; MARCH et al., 2003; DE la FE et al., 2006; DAWO e MOHAM, 2007).

As técnicas de inibição de crescimento, imunoperoxidase, aglutinação em lâmina e tubo, e imunodifusão têm sido relevantes no diagnóstico das micoplasmoses, tendo como principal vantagem o baixo custo de realização, além de boa sensibilidade e especificidade (NASCIMENTO et al., 1986; IMADA et al., 1987). Outras técnicas sorológicas têm sido padronizadas para identificação da resposta imune induzida por micoplasmas, entre as quais destaca-se o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (LAMBERT et al., 1998; LE GOFF e THIAUCOURT, 1998; JANOVSKY et al., 2001; DAWO e MOHAM, 2007).

O ELISA foi estabelecido para o diagnóstico da agalaxia contagiosa causada por *M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC em 1982. Métodos sorológicos são geralmente muito usados como auxiliar no diagnóstico, mas sem a pretensão de substituir o cultivo e identificação do agente infeccioso que é o diagnóstico definitivo (BELAID et al., 1990; LAMBERT et al., 1998).

Mais recentemente, alguns ELISA têm sido padronizados a partir da purificação de antígenos de bactérias obtidas por cultivo e pela produção de proteínas recombinantes em vetores apropriados. Algumas proteínas têm sido identificadas como importantes indutoras de resposta imune contra *M. agalactiae* e de outros micoplasmas. Rosati et al., (2000) desenvolveram um ELISA utilizando uma proteína recombinante de 48 kda. Ao testarem

soros de ovinos com e sem sinais clínicos da infecção, concluíram que o ELISAr (ELISA recombinante) tem potencial para diagnóstico em situações de campo.

O preparo de um ELISA indireto com antígeno de *Mycoplasma conjunctivae* extraído com tween-20 foi proposto por Belloy et al. (2001). Para validação do teste, utilizaram soros de 87 ovinos de rebanhos livres de ceratoconjuntivite e 249 amostras de rebanhos com presença da infecção, encontrando altos títulos de anticorpos nos rebanhos infectados com percentual médio de positivos de 72%; os títulos dos animais negativos variou de 0-41%, com *cut-off* de 37%, revelando uma boa sensibilidade do teste.

As técnicas laboratoriais podem sofrer interferência de diferentes variáveis. Lizeu e Danelli (2004) demonstraram que antígeno de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (*M. mm* LC), tratado com tampão β -mercaptoetanol conferiu maior estabilidade e integridade às células quando comparado ao tampão tris-salina gelada, estocados a 4°C, mas não houve diferença significativa na densidade óptica do ELISA.

A prevalência de anticorpos contra *M. agalactiae* foi investigada em rebanhos caprinos e ovinos de 80 animais sem sinais clínicos da República Tcheca e 137 animais com sinais clínicos da Jordânia, através de um ELISA indireto. Não houve detecção de animais positivos na República Tcheca, enquanto que resultados positivos ou inconclusivos foram detectados em 5,8% e 8,0% dos animais da Jordânia, respectivamente (MADANAT et al., 2002).

Alberti et al. (2008) caracterizaram uma lipoproteína de superfície de 60 kDa e prepararam um antígeno recombinante para diagnóstico de *M. capricolum* subsp. *capricolum* através de ELISA; os resultados sugerem que a p60 é um marcador potencial para infecções. Os autores observaram também uma baixa reação cruzada quando a p60 foi confrontada com soro contra p48 recombinante de *M. agalactiae*, sugerindo uma semelhança estrutural e funcional entre as duas proteínas.

3.8 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

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. As primeiras drogas usadas na tentativa de tratar a ACOC foram os compostos de arsênico, particularmente sódio e partículas de sal de zinco. Muitos agentes antimicrobianos tais como, macrolídeos e lincosamídeos (ex. tilosina, lincomicina), tetraciclina, tiamulin, e fluoroquinolonas (enrofloxacina e danofloxacina), são eficazes contra

os micoplasmas, embora já se tenha relatos de resistência aos antibióticos mais constantemente utilizados (STIPKOVITS et al., 1984; LORIA et al., 2003; ASSUNÇÃO et al., 2006; ANTUNES et al., 2007).

Mesmo após o uso intensivo de antibióticos, muitas vezes os animais tornam-se portadores do microrganismo e desenvolve resistência aos antibióticos (BELAID et al., 1990; ANTUNES et al., 2007). A maioria dos profissionais médicos veterinários recomendam a administração sistêmica de antibióticos, mas, em certas condições, quando a mastite crônica está instalada, a aplicação intra-mamária nas fêmeas secas, também deve ser recomendada (CORRALES et al., 2007).

Alternativas a essas drogas estão surgindo. Teste de susceptibilidade *in vitro* de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* e *M. putrefaciens* a *Artemisia herba-alba* e *Artemisia arborescens* foi testada e os resultados indicam que as três espécies foram susceptíveis as duas plantas (AL-MOMANI et al., 2007).

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).

Em áreas endêmicas, o controle objetiva reduzir a disseminação da infecção intra e inter-rebanhos pela redução de movimentação de animais, higienização das instalações, antibioticoterapia e vacinação (BERGONIER et al., 1997). O controle das infecções por micoplasmas através da vacinação é limitado a algumas infecções específicas, por que somente umas poucas vacinas estão disponíveis.

No caso específico da ACOC, as primeiras vacinas propostas datam da década de 1970, quando Foggie et al. (1970) utilizaram uma vacina atenuada de *M. agalactiae* para imunização de caprinos. Posteriormente, poucos trabalhos foram publicados a esse respeito, retornando na década de 1990. 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 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. Buonavoglia et al. (1998) e Greco et al. (2002) observaram que vacina inativada com adjuvante oleoso induziu títulos mais altos e mais duradouros do que a vacina com hidróxido de alumínio como adjuvante.

Antígenos inativados com fenol e com saponina mostraram maior eficiência do que os inativados com formaldeído, tratamento térmico e hipoclorito de Sódio (TOLA et al., 1999). 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*, uma vez que mantiveram a capacidade imunogênica das amostras, podendo ser utilizados na preparação de vacinas contra ACOC. Continuando este estudo, porém com vacina contendo apenas *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC inativados, De la Fe et al. (2007) demonstraram que os anticorpos persistiram por mais de seis meses após a administração de duas doses da vacina.

Vacinas vivas atenuadas de *M. agalactiae* são mais efetivas do que vacinas inativadas, mas elas não são permitidas em todos os países que são afetados pela ACOC. Se animais saudáveis são vacinados preventivamente, eles não apresentam infecção generalizada nem sinais clínicos, mas uma infecção temporária do úbere pode aparecer (MADANAT et al., 2001). As vacinas inativadas estão livres destas desvantagens, mas a resposta imune que elas produzem é mais baixa, menos persistentes e necessitam de repetições, preferencialmente antes e após o parto (LEON-VIZCAINO et al., 1995).

Vacinações são consideradas apropriadas em regiões endêmicas e 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. Mesmo nestas regiões e principalmente em rebanhos livres da doença, deve-se recomendar a prática da quarentena de animais recém adquiridos, numa tentativa de evitar a introdução destes e de outros microrganismos patogênicos.

3.9 SITUAÇÃO NO BRASIL

No Brasil, o único diagnóstico de agalaxia contagiosa em caprinos tinha sido relatado em 1942, em um surto da doença ocorrido no Estado de São Paulo, descrito por Penha e D'Ápice (1942). Todavia, naquele período, o microrganismo isolado, apesar de apresentar as características dos micoplasmas, não foi identificado. Além do mais, considerando-se que casos de ACOC normalmente não cursam com pneumonia e que a espécie *M. agalactiae* não fermenta a glicose, ao contrário do observado pelos autores, pode-se deduzir que a enfermidade descrita deveu-se a outra espécie de *Mycoplasma* (AZEVEDO, 2005). Desde então, não havia relatos ou confirmação da doença no País até 2001, apesar dos isolamentos

de outras espécies de *Mycoplasma* em caprinos e ovinos (RIBEIRO et al., 1995a; RIBEIRO et al., 1995b; NASCIMENTO et al., 1986; MULLER et al., 1998). Passados 60 anos, *M. agalactiae* foi isolado de caprinos leiteiros com sinais clínicos característicos no Estado da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO, 2005).

Azevedo et al. (2006) 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.

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 defesa sanitária dos estados e municípios e pelo intenso comércio de animais vivos, destinados ao abate e para 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.

Levantamento recente 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 ACOC, demonstrando a ampla distribuição da doença (BANDEIRA, 2007). Dos Animais testados 7,5% apresentaram resultado positivo para *M. agalactiae* e 8,2% anticorpos contra o vírus da artrite-encefalite caprina. Por apresentarem sinais clínicos que podem ser confundidos, deve-se estabelecer sempre que possível, o diagnóstico diferencial entre estas enfermidades, pois medidas devem ser adotadas na perspectiva de reduzir a disseminação dos agentes para outros rebanhos. Neste sentido, Campos (2008) padronizou um ELISA para diagnóstico da enfermidade utilizando a proteína G como conjugado, o que permitiu a identificação de caprinos infectados. Para tanto, soros de animais coletados em rebanhos sabidamente livres da enfermidade foram comparados com soros de animais de rebanhos que apresentavam sinais clínicos de ACOC.

Nos rebanhos afetados 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) descreveram

uma metodologia para obtenção de 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 (NICHOLAS e AYLING, 2003 e 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, o que é danoso à saúde pública têm sido pesquisadas alternativas terapêuticas.

Assim, Marinho (2008) avaliou um bioterápico na trigésima decimal (D30), produzido com *M. agalactiae* isolado de uma cabra com ACOC, para o tratamento da doença em 106 caprinos em surtos ocorridos na Paraíba. O bioterápico, é um medicamento homeopático, preparado de acordo com a metodologia preconizada na farmacopéia homeopática brasileira (1997), segundo as idéias de Costa (1988) e a partir do manual de normas técnicas para farmácia homeopática (2003), aplicados ao método Hahnemanniano. Inicialmente foi preparada uma suspensão de *M. agalactiae*, por lavagem das colônias crescidas em meio sólido com solução salina. A seguir, 1ml da suspensão bacteriana foi diluída em 9ml de solução salina e submetido a 100 succussões vigorosas e regulares, obtendo-se, assim, a primeira dinamização decimal. Na seqüência, este procedimento foi repetido 30 vezes, obtendo-se a trigésima decimal (D30).

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, porém não eliminou o estado de portador durante pelo menos seis meses após o tratamento. Ressalta-se assim a importância do controle desta doença, por meio do bioterápico, produto que não oferece risco para a saúde humana e animal bem como o problema tecnológico dos efeitos inibidores dos antibióticos sobre os lactobacilos utilizados na fabricação de produtos lácteos. O tratamento para ACOC através da bioterapia mostrou-se viável, por ser compatível com o manejo da pecuária orgânica, bem como de redução dos custos com o medicamento. Entretanto, este novo protocolo requer avaliação mais ampla, em diferentes surtos.

Diante dessa realidade há necessidade de associação destas medidas, com ênfase no diagnóstico e no desenvolvimento de vacinas com amostras locais, como medidas estratégicas de controle da doença, até porque o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO), não incluiu um plano de controle da ACOC por falta de métodos diagnósticos confiáveis e rápidos disponíveis no país (CASTRO, 2006). A disposição de um ELISA para diagnóstico sorológico permitirá o acompanhamento de animais em locais de aglomeração de

animais, como feiras, exposições e leilões, o que evitará a disseminação da infecção para outros rebanhos, contribuindo para a sustentabilidade da atividade na região semi-árida.

3.10 REFERÊNCIAS

ALBERTI, A.; ROBINO, P.; CHESSA, B.; ROSATI, S.; ADDIS, M.F.; MERCIER, P.; MANNELLI, A.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; BANDINO, E.; THIERY, R.; PITTAU, M. Characterisation of *Mycoplasma capricolum* P60 surface lipoprotein and its evaluation in a recombinant ELISA. **Vet. Microbiol.**, v. 128, p. 81-89, 2008.

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.

AL-MOMANI, W.; ABU-BASHA, E.; JANAKAT, S.; NICHOLAS, R.A.; AYLING, R.D. In vitro antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three *Mycoplasma* species. **Trop. Anim. Health Prod.**, v, 39, n. 7, p. 515-519, 2007.

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.**,2007 doi:10.1016/j.tvjl.2007.05.008.

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.; ALCÂNTARA, M.D.B.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A.; CASTRO, R.S.; CAMPOS, C.A.M. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats in Brazil. Epidemiologic findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

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

AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; BARRETO, M.L.; FREIRE, M.L.S.; BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S. Outbreaks of contagious agalactia in sheeps and goas in Northeast of Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** 2008 (no prelo)

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.

BELAID, B.; LE GOFF, C.; LEFÈVRE, P.C. Epidemiologic survey and serodiagnosis of contagious agalactia of small ruminants in Eastern Algeria. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, v. 43, n. 1, p. 37-41, 1990.

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

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

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. **ELISA proteína-G para o diagnóstico de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos.** 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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

CASTRO, R.S. Política oficial em sanidade ovina no Brasil. **In: Anais.... XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, 2006, Cuiabá.

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.

CLYDE Jr, W.A. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. **J. Immunol.**, v. 92, p. 958-965, 1964.

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.

COSTA, R.A. **Homeopatia Atualizada**. 3ª ed. Escola Brasileira, Petrópolis, p.104-106, 1998.

COTTEW, G. S.; YEATS, F. R. Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. **Aust. Vet. J.** v. 59, p. 77-81, 1982.

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.

DAWO, F.; MOHAN, K. Development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to *Mycoplasma crocodyli* infection in crocodiles (*Crocodylus niloticus*). **Vet. Microbiol.**, v. 119, n. 2-4, p. 283-289, 2007.

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.; ASSUNCAO, P.; ANTUNES, T.; ROSALES, R.S.; POVEDA, J.B. Microbiological survey for *Mycoplasma* spp. in a contagious agalactia endemic area. **Vet. J.**, v. 170, p. 257-259, 2005.

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.**, 2006, doi:10.1016/j.tvjl.2006.10.021.

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.

Farmacopéia homeopática brasileira. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, 1997.

FASANYA, O.O.A.; ADEGBOYE, D.S.; MOLOKWU, E.C.I.; DIM, N.I. Microbiology of the genitalia of nulliparous and postpartum savanna brown goats. **Vet. Res. Com.**, n. 11, p. 191-198, 1987.

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.

FLITMAN-TENE, R.; MUDAHI-ORENSTEIN, S.; LEVISOHN, S.; YOGEV, D. Variable lipoprotein genes of *Mycoplasma agalactiae* are activated in vivo by promoter addition via site-specific DNA inversions. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 7, p. 382-3830, 2003.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J.R.; ERDAĞ, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats. The serial passage in goats of an attenuated strain of *Mycoplasma agalactiae* AIK40. **Res Vet Sci.**, v. 11, n. 5, p. 477-479, 1970.

GIL, M. C.; MENDOZA, M. H.; REY, J.; ALONSO, J. M.; POVEDA, J. B.; MENDOZA, J. H. Isolation of *Mycoplasmas* from the external ear canal of goats affected with contagious agalactia. **Vet. J.**, v. 158, p. 152-154, 1999.

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. B Infect. Dis. Vet. Public Health.**, v. 50, n. 10, p. 484-487, 2003.

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.

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.

IBGE, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2006>. Acesso em 27/01/2008.

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

JANOVSKY, M.; FREY, J.; NICOLET, J.; BELLOY, L.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; GIACOMETTI, M. *Mycoplasma conjunctivae* infection is self-maintained in the Swiss domestic sheep population. **Vet. Microbiol.**, v. 83, p. 11-22, 2001.

KHAN, L.A.; MILES, R.J.; NICHOLAS, R.A.J. Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H₂O₂. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, n. 3, p. 181-188, 2005.

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.

KONIGSSON, 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.; CABASSE, E. Serologie de l'agalaxie contagieuse des brebis: comparaison ELISA-Fixation du complement. **Rev. Med. Vet.**, v.140, p.107-112, 1989.

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.

LE GOFF, C.; THIAUCOURT, F. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Vet. Microbiol.**, v. 60, p. 179-191, 1998.

LEON-VIZCAÍNO, L.; ABELLÁN, G.F.; PABLO, C.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.

LIZEU, J. O. P.; DANELLI, M. G. M.. Importância da resistência osmótica na estabilidade do antígeno celular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC em ensaio imunoenzimático (ELISA). **Ciênc. Rural**, v. 34, n. 2, p. 591-593, 2004.

MacOWAN, K.J.; BRAND, T.F.; MCGILLVERAY, N. HUNTER, A.R. Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae*. **J. Hyg. Camb.**, v. 93, p. 455-463, 1984.

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

MADANAT, A.; ZENDULKOVA, D.; LANY, P.; POSPÍŠIL, Z.; P. PÍHAL, P. Prevalence of *Mycoplasma agalactiae* antibodies in Czech and Jordanian herds of small ruminants. **Acta Vet. Brno.**, v. 71, p. 37-44, 2002.

Manual de normas técnicas para farmácia homeopática, 3ª edição. Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas, Curitiba, 2003.

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

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**. 2008. 118 p. (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

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

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

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.

NICHOLAS R.A.J.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Res. Vet. Sci.** v. 74, n. 2, p. 105-112, 2003.

OIE, 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/wahid-prod>. Acesso em 22/01/2008.

OROS, J.; FERNANDEZ, A.; RODRIGUEZ, J.L.; RODRIGUEZ, F.; POVEDA, J.B. Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. **Zentralbl. Veterinarmed B.**, v. 44, n. 2, p. 99-104, 1997.

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

PERREAU P., CUONG T., VALLÉE A., Isolement d'un mycoplasme du groupe *Mycoplasma mycoides* var. *capri* à partir d'un lait de mammite chez la chèvre, **Bull. Acad. Vet. Fr.**, v. 45, p.109-116, 1972. 1972.

RAZIN, S. Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. **Bioscience Reports**, 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.

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

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; NASCIMENTO, M.G.F.; LIGNON, G.B. Ocorrência de micoplasmas em caprinos através das técnicas de Imunofluorescência Indireta e Inibição de crescimento. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 26-28, 1995b.

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.

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

RODRIGUEZ, J.L.; ERMEL, R.W.; KENNY, T.P.; BROOKS, D.L.; DAMASSA, A.J. Polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion for selected members of the "Mycoplasma mycoides cluster" and *Mycoplasma putrefaciens*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, n. 2, p. 186-190, 1997.

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.

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

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

SANCHIS, R.; ABADIE, G.; LAMBERT, M.; ABASSE, E.; DUFOUR, P.; GUIBERT, J.M.; PEPIN, M. Inoculation of lactating ewes by the intramammary route with *Mycoplasma*

agalactiae: comparative pathogenicity of six field strains. **Vet. Res.**, v. 31, n. 3, p. 329-337, 2000.

SINGH, N.; RAJYA, B.S.; MOHANTY, G.C. Pathology of *Mycoplasma agalactiae* induced granular vulvovaginitis (GVV) in goats. **Cornell Vet.**, v. 65, n. 3, p. 363-373, 1975.

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

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

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

TESSLER, J. Differentiation Among Strains of Goat *Mycoplasma* by Incident Light Immunofluorescence. **Can. J. Comp. Med.** v. 37, p. 405-408, 1973.

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.

VILEI, E.M.; KORCZAK, B.M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. **Vet. Res.** v. 37, n. 6, p. 779-790, 2006.

WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Ames: Iowa S. Univ. Press., 173 p, 1994.

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

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Padronização de um ELISA proteína-G indireto para o diagnóstico de agalaxia contagiosa em pequenos ruminantes.

RESUMO

Ensaio imunoenzimático indireto utilizando antígeno total (ELISA-Gt) e sonicado (ELISA-Gs) de *Mycoplasma agalactiae* e conjugado de proteína-G foi padronizado para detecção de anticorpos em caprinos. A padronização da técnica foi realizada utilizando soros caprinos com e sem sinais clínicos de agalaxia contagiosa. Quarenta e seis soros caprinos coletados com intervalo de 45 dias, obtidos em rebanho infectado com sinais clínicos e 40 soros caprinos de rebanhos livres da infecção foram utilizados para avaliação da técnica. A presença de *M. agalactiae* no rebanho foi confirmada por cultivo de leite em meio Hayflick modificado. Não houve diferença significativa entre os valores da razão positivo/negativo (P/N) dos soros controles quando utilizado antígeno total ou sonicado. A sensibilidade relativa do ELISA-Gt e ELISA-Gs foi de 77,27% e 88,63%, respectivamente, enquanto a especificidade foi de 95,24% para ambos. Pesquisa de anticorpos no rebanho infectado revelou aumento significativo dos percentuais de densidade óptica (DO) em soros caprinos, coletados com intervalo de 45 dias. Conclui-se que os ELISA podem ser úteis para identificação de rebanhos acometidos por agalaxia contagiosa de pequenos ruminantes, com uma relativa vantagem para o ELISA-Gs.

Palavras-chave: caprinos, *Mycoplasma* spp., sorologia, diagnóstico.

ABSTRACT

An indirect ELISA using whole (ELISA-Gt) and sonicated (ELISA-Gs) antigen of *Mycoplasma agalactiae* with protein-G conjugate was development to detection of antibodies in goats. A total of 46 samples serum were obtained from goats in infected flock with clinical signs in forty-five days period and 40 samples in free herds of disease to standardization and application of ELISA test. The infection status was confirmed by culture of *M. agalactiae* from milk samples. Do not had statistical difference between positive and negative controls

serum (P/N) when whole or sonicated antigen were used. The sensibility of ELISA-Gt and ELISA-Gs were of 77,27% and 88,63%, respectively. Specificity were 95,24% for both ELISA. In conclusions, the indirect ELISA-Gt or ELISA-Gs should be utilized as tools for diagnostic of contagious agalactia in goats.

Keywords: goats, *Mycoplasma* spp., sorology, diagnostic.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma agalactiae é o principal agente envolvido na Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC), caracterizada clinicamente por mastite com diminuição da produção de leite seguida de agalaxia, poliartrite e ceratoconjutivite. 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).

A agalaxia contagiosa está mundialmente disseminada, ocorrendo endemicamente na maioria dos países mediterrâneos, oeste da Ásia, África e EUA (DaMASSA, 1983; EGWU et al., 2001). No Brasil, *M. agalactiae* foi isolado e identificado por imunoperoxidase e PCR em surtos nos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco, região Nordeste do país, que ocorreram com taxas de morbidade de até 100% e de mortalidade em animais jovens e adultos em torno de 90% e 5%, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006).

O diagnóstico laboratorial da ACOC baseia-se no isolamento *M. agalactiae* ou na detecção de seus antígenos. O isolamento bacteriano é difícil e exige pessoal técnico especializado, além do alto custo envolvido e do longo tempo para sua conclusão. O diagnóstico também pode ser feito mediante a utilização de técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos, como *western blotting* (DE la FE et al., 2006), 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).

A OIE preconiza a fixação de complemento como técnica diagnóstica de micoplasmas para trânsito internacional de animais, mas reconhece suas limitações em termos de sensibilidade, devido ao grande número de reações cruzadas e falso positivas em comparação com outros métodos diagnósticos. Por isto, bem como pela consistência dos resultados, os

ELISA têm sido recomendados como alternativa diagnóstica para essas infecções (OIE, 2004).

ELISA utilizando antígenos preparados a partir de célula bacteriana total (PÉPIN et al., 2003; KITTELBERGER et al., 2006), sonicada (LAMBERT et al., 1998) e proteínas recombinantes (KITTELBERGER et al., 2006; FUSCO et al., 2007), conjugados de proteína G/peroxidase e IgG/peroxidase (LAMBERT et al., 1998; PÉPIN et al., 2003) são rotineiramente empregados, com bons resultados em termo de sensibilidade e especificidade.

A proteína-G possui grande afinidade de ligação com imunoglobulinas G (IgG) de caprinos e ovinos (AKERSTROM et al., 1985). Sua aplicação em um ELISA para o diagnóstico de ACOC, possibilita a realização simultânea do teste para as duas espécies, com redução de reações falso-positivas como descrito por Lambert et. al. (1998).

Segundo Pépin et al., (2003), para o estabelecimento de estratégias de controle e classificação de um rebanho em relação a ACOC, 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.

No Brasil não existe uma rotina de diagnóstico sorológico para ACOC, o que impede o avanço do controle da enfermidade. Neste sentido, objetivou-se padronizar um ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*M. agalactiae* em rebanhos caprinos utilizando conjugado de proteína-G.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação de *Mycoplasma agalactiae*

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

2.2 Produção dos Antígenos

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

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

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

2.3 Padronização do ELISA-G

Para a padronização do ELISA-Gt (utilizando o antígeno total) e ELISA-Gs (antígeno sonicado), as concentrações dos antígenos e diluições dos soros foram definidas de forma a se obter as melhores condições de diferenciação entre soros positivos e negativos. Assim, os antígenos foram diluídos seriadamente (1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) em solução tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 e titulados frente à diluição de 1:50 e 1:100 de seis soros positivos e seis negativos para ACOC. O conjugado de proteína-G peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizado de acordo com recomendações do fabricante.

Os ELISA foram realizados utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços (Nunc-Immuno Plate Maxisorp Surface; NUNC Brand Products, Dinamarca) sensibilizadas com o antígeno e incubadas em câmara úmida “overnight” a 37°C. Três lavagens com PBS contendo 0,1% Tween 20 (v/v) (PBS-T) foram realizadas e as placas bloqueadas pela adição de 2% de BSA em PBS por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBS-T, 100µL das amostras de soros diluídas em PBS contendo 2% de leite em pó desnatado e 10mM de EDTA (p/v) foram distribuídas em cada poço, as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com PBS-T, 100µL do conjugado de proteína G-peroxidase diluído 1:90.000 foram distribuídos por poço e as placas incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, 100µL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,1mg/ml de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio (v/v) foram adicionados. Após 15 minutos, a reação foi bloqueada com 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada com filtro de 450nm.

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

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

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

2.4 Sensibilidade e especificidade relativas dos ELISA

Após a padronização das concentrações dos antígenos (diluição 1:400) e soros (1:100), os ELISA foram avaliados considerando-se seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), bem como o indicador de concordância ajustado ($Kappa=k$) (PEREIRA, 1999), com base no teste de 86 amostras de soro caprino. Para tanto, foram usados soros de um rebanho afetado por ACOC, não tratado, submetidos a dois testes com intervalo de 45 dias; em paralelo, foi feita a pesquisa de *M. agalactiae* nos mesmos animais, utilizando-se amostras de leite colhidas em solução salina glicerinada a 50% e processadas para isolamento e identificação bioquímica de acordo com Azevedo et al. (2006). Nesse rebanho, durante um período de três semanas, 100% das 23 cabras desenvolveram sinais clínicos de ACOC, com

diminuição da produção de leite em 95,7% (22/23), mastite em 17,4% (4/23), artrite e poliartrite em 43,8% (10/23) e ceratoconjuntivite em 17,4% (4/23). Para efeito dos cálculos, foram considerados verdadeiros positivos os 21 animais positivos no cultivo e como negativos os soros de dois animais negativos ao cultivo desse rebanho mais 40 amostras previamente descritos no item 2.3. Em seguida, foram comparados os ELISA frente aos isolamentos realizados com as amostras colhidas com intervalo de 45 dias.

3 RESULTADOS

3.1 Produção dos Antígenos

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

3.2 Padronização do ELISA-G

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

Entre os antígenos testados não houve diferença significativa entre os valores da razão P/N, demonstrando ótima capacidade de discriminação de ambos os antígenos, como descrito nas tabelas 1 e 2.

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

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

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

Tabela 2 - Titulação do antígeno total e sonicado frente a soro caprino diluído 1:100 utilizando ELISA-G.

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

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

Os ELISA quando testados frente aos soros hiperimunes de coelhos contra *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. capricolum*, *M. putrefaciens* apresentaram reações positivas nos três primeiros e reação negativa para *M. putrefaciens*, como representado na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados percentuais das DO dos soros de coelhos hiperimunizados contra *Mycoplasma* spp.

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

¹Antígenos diluídos 1:400

²soros de coelhos diluídos 1:100

³“Cut-off” relativo

3.3 Aplicação dos ELISA em rebanho caprino monitorado para ACOC

Os resultados dos soros caprinos testados pelos ELISA estão apresentados nas tabelas 4 e 5, com os respectivos parâmetros empregados na avaliação dos testes, onde se observa especificidade de 95,24% para ambos os testes e sensibilidade de 77,27% e 88,63%, com boa e ótima concordância com o isolamento, para ELISA-Gt e ELISA-Gs, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de *M. agalactiae*.

Teste		<i>M. agalactiae</i> *		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA-Gt	Positivo	34	2	36
	Negativo	10	40	50
Total		44	42	86

* Verdadeiros positivos = 44 amostras de animais positivos no cultivo; Verdadeiros negativos = 2 amostras de animais negativos ao cultivo e 40 de rebanhos livres

Sensibilidade = 77,27%; Especificidade = 95,24%; *Kappa* = 0,72 (boa concordância).

Tabela 5- Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de *M. agalactiae*.

Teste		<i>M. agalactiae</i> *		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA-Gs	Positivo	39	2	41
	Negativo	5	40	45
Total		44	42	86

* Verdadeiros positivos = 44 amostras de animais positivos no cultivo; Verdadeiros negativos = 2 amostras de animais negativos ao cultivo e 40 de rebanhos livres

Sensibilidade = 88,63%; Especificidade = 95,24%; *Kappa* = 0,84 (ótima concordância).

Os resultados dos testes aplicados às amostras de soros do rebanho afetado por ACOC colhidas com intervalo de 45 dias em paralelo ao isolamento de *M. agalactiae* estão representados nas tabelas 6 e 7. Observa-se que, no teste da primeira coleta o ELISA-Gs

detectou cinco amostras positivas a mais que o ELISA-Gt, com total concordância quanto à detecção das negativas. Na segunda coleta houve concordância em todos os resultados.

Tabela 6 - Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gt em comparação com o isolamento de *M. agalactiae* de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.

Teste		<i>M. agalactiae</i> * (1 ^a Coleta)		<i>M. agalactiae</i> (2 ^a Coleta)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
ELISA-Gt	Positivo	11	2	21	2
	Negativo	10	0	0	0
Total		21	2	21	2

* Isolamento de amostras de leite.

Tabela 7 -Resultados de soros caprinos testados pelo ELISA-Gs em comparação com o isolamento de *M. agalactiae* de um surto de agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos, com intervalo de 45 dias.

Teste		<i>M. agalactiae</i> * (1 ^a Coleta)		<i>M. agalactiae</i> * (2 ^a Coleta)	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
ELISA-Gs	Positivo	16	2	21	2
	Negativo	5	0	0	0
Total		21	2	21	2

* Isolamento de amostras de leite.

Os valores dos percentuais das DO dos caprinos no período de monitoramento do rebanho estão representados nas figuras 1 e 2. Observa-se um aumento das leituras na segunda coleta em todos os animais, quando comparados com a primeira.

Figura 1. Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gt, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.

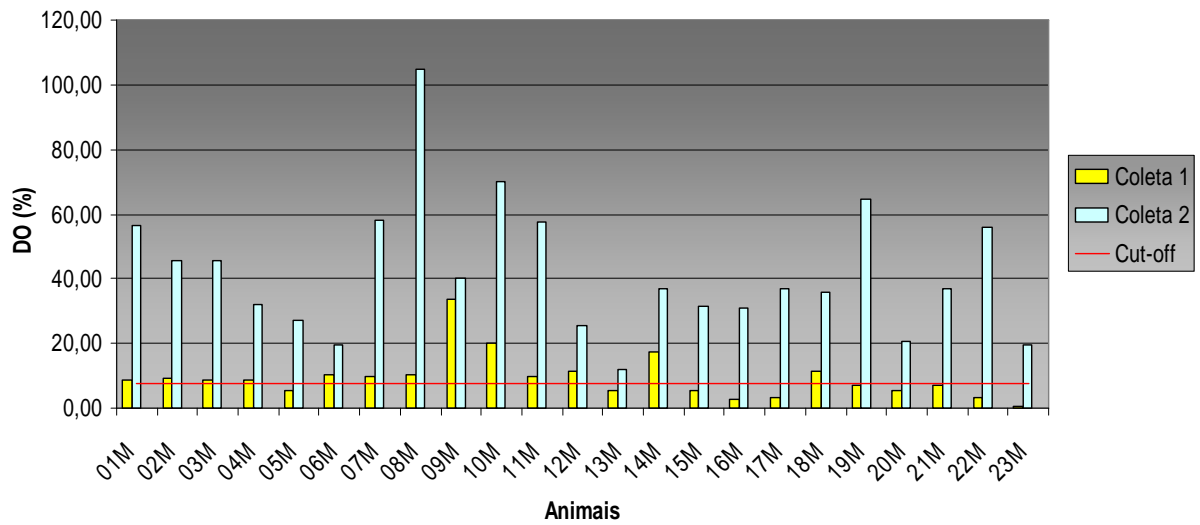
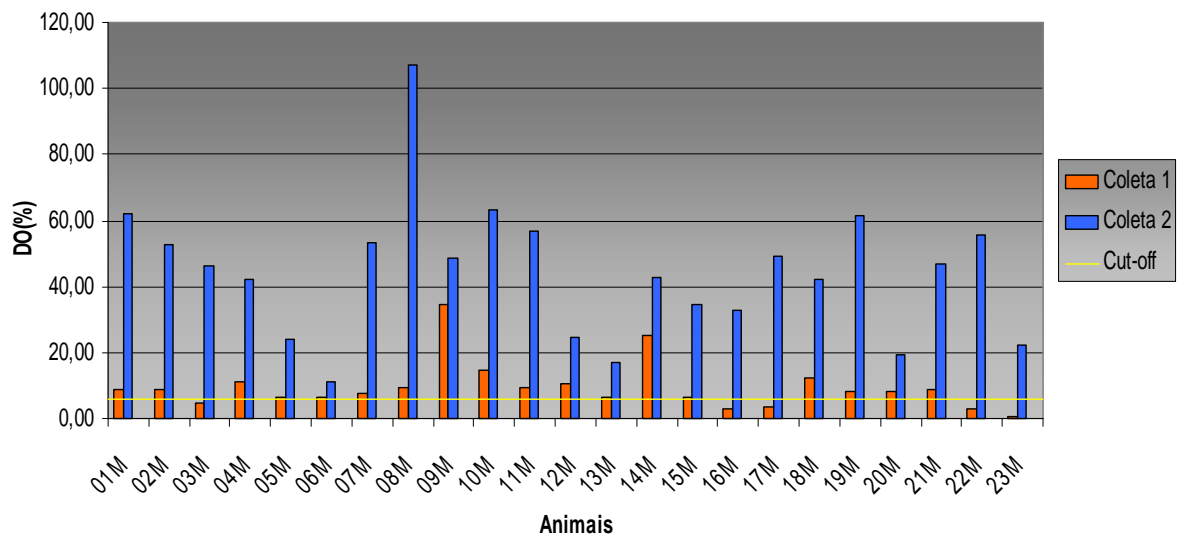


Figura 2. Percentuais das DO de caprinos testados no ELISA-Gs, entre duas coletas intervaladas de 45 dias.



4 DISCUSSÃO

As condições de cultivo empregadas neste trabalho mostraram-se adequadas para o crescimento de *M. agalactiae*. A quantidade de $5,5 \times 10^7$ ufc/ml obtida foi suficiente para a obtenção de antígenos com concentração protéica suficiente para a utilização no ELISA.

As concentrações dos antígenos utilizadas neste trabalho foram inferiores as relatadas por Fusco et al. (2007) que utilizaram 10 µg/ml de uma proteína recombinante em um ELISA para diagnóstico de *M. agalactiae*. Neste trabalho houve maior economia dos reagentes para realização dos testes, mantendo-se adequados padrões para diferenciação entre soros positivos e negativos. Resultados discordantes aos obtidos neste trabalho foram relatados por Dawo e Mohan (2007), durante padronização de um ELISA indireto para o diagnóstico de *M. crocodyli*. Os autores encontraram resultados inconsistentes na discriminação entre positivos e negativos ao compararem o antígeno total com o sonicado.

Os ELISA-Gt e ELISA-Gs demonstraram alta repetibilidade, com coeficiente de variação inferior ao limite de 20% recomendado pela OIE, o que é altamente desejável na padronização de um método diagnóstico (OIE, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2007) ao padronizar um ELISA-G para o diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes, encontrando um coeficiente de variação igual a 4,74%.

A proteína-G apresenta uma grande afinidade de ligação com as imunoglobulinas G (IgG) de caprinos e ovinos (AKERSTROM et al., 1985), por essa razão sua utilização em um ELISA indireto para o diagnóstico de ACOC, permitirá o teste de caprinos e ovinos simultaneamente, com redução de reações falso-positivas, como descrito por Lambert et al. (1998).

Comparando os resultados dos ELISA com os apresentados por Pépin et al. (2003) verifica-se uma semelhança em termos de especificidade, mas os resultados divergem quanto a sensibilidade. Os autores relataram sensibilidade de 48%, 72% e 82%, conforme o antígeno empregado no ELISA, com melhores resultados nos kits que utilizavam antígeno total e recombinante.

Os resultados positivos obtidos nos ELISA-Gt e ELISA-Gs quando soros de coelhos hiperimunizados contra *M. arginini* e *M. capricolum* foram testados, sugerem a presença de proteínas homólogas entre estas espécies e *M. agalactiae*, mesmo sendo distantes filogeneticamente (WOUBIT et al., 2007). Resultado negativo do soro contra *M. putrefaciens* precisa ser melhor investigado. Do ponto de vista clínico-epidemiológico, este achado não interfere significativamente no diagnóstico, visto que estes microrganismos podem estar

associados em casos de ACOC (MULLER et al., 1998). A presença de reações cruzadas poderá ser resolvida a partir da produção de antígenos purificados e utilização de proteínas recombinantes (WOUBIT et al., 2007; ALBERTI et al., 2008).

Resultados discordantes entre sorologia e isolamento podem ser justificados pelas limitações de ambas as técnicas. Este fenômeno pôde ser observado claramente no rebanho utilizado para avaliação dos ELISA, quando acompanhado pela sorologia e cultivo. Os resultados da cultura revelaram que 91,3% (21/23) das amostras apresentaram crescimento de *M. agalactiae*. Na primeira coleta, os ELISA-Gt e ELISA-Gs, identificaram 56,5% (13/23) e 78,3% (18/23) dos animais positivos, respectivamente. Resultados negativos na primeira coleta, provavelmente deveram-se aos animais que ainda não tinham se infectado ou que não possuíam níveis de anticorpos suficientes para serem detectados pelos ELISA. Infecção experimental de caprinos com *M. agalactiae* poderia ser realizada para avaliação da resposta imunológica.

Na segunda coleta, 100% dos animais foram positivos aos dois ELISA, com elevação significativa dos percentuais de DO, como demonstrado nas figuras 1 e 2. Aumento significativo dos valores de DO tem sido observados após a implantação de esquemas de imunização (TOLA et al., 1999; GRECO et al., 2002; DE la FE et al., 2007).

Estes achados justificam a necessidade de monitoramento dos rebanhos para definição do perfil sorológico dos animais, contribuindo para o entendimento da dinâmica epidemiológica da doença. Nesta propriedade, as coletas foram realizadas no início da infecção quando ainda não havia sido utilizado antibiótico para o tratamento da enfermidade, o que poderia ter influenciado os resultados dos cultivos.

Como a padronização do ELISA-Gt e ELISA-Gs foi baseada na utilização de um pequeno número de animais, recomenda-se a aplicação destes testes em um maior número de amostras de caprinos pertencentes a rebanhos infectados e não infectados por *M. agalactiae*.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, considera-se que os ELISA padronizados podem ser úteis para a identificação de infecções por *M. agalactiae* em rebanhos caprinos, com maior sensibilidade relativa e nível de concordância do ELISA-Gs quando comparado ao ELISA-Gt.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, A.; ROBINO, P.; CHESSA, B.; ROSATI, S.; ADDIS, M. F.; MERCIER, P.; MANNELLI, A.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; BANDINO, E.; THIERY, R.; PITTAU, M. Characterisation of *Mycoplasma capricolum* P60 surface lipoprotein and its evaluation in a recombinant ELISA. **Vet. Microbiol.**, v.128, p.81–89, 2008.

AKERSTRÖM, B.; BRODIN, T.; REIS, K.; BJÖRCK, L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J. Immunol.**, v.135, n.4, p.2589-2592, 1985.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; TABOSA, I.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A.; CASTRO, R.S.; CAMPOS, C.A.M. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats in Brazil. Epidemiologic findings. **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 48, 2002.

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.

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

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

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.

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

DAWO, F.; MOHAN, K. Development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to *Mycoplasma crocodyli* infection in crocodiles (*Crocodylus niloticus*). **Vet. Microbiol.**, v. 119, p. 283–289, 2007.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

LETESSON, J.J.; TIBOR, A.; VAN EYNDE, G.; WANSARD, V.; WEYNANTS, V.; DENOEL, P.; SAMAN, E. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and

goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4, n.5, p.556-564, 1997.

MADANAT,A.; ZENDULKOVA, D.; LANY, P.; POSPÍŠIL ,Z.; P. PÍHAL, P. Prevalence of *Mycoplasma agalactiae* antibodies in Czech and Jordanian herds of small ruminants. **Acta Vet. Brno.**, v.71, p. 37-44, 2002.

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

NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O.; AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, M.G.F. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: **Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)**. XIV, Vienna, p. 45-46, 2002.

OLIVEIRA, M. M. M. **Diagnóstico e controle de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos**. Recife - Pernambuco. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2007. 114p. (Tese de Doutorado).

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

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2006. Disponível em: <http://www.oie.int>, acesso: fev/2007.

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.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999, 596p.

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

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.

WOUBIT, S.; MANSO-SILVÁN, L.; LORENZON, S.; GAURIVAUD, P.; POUMARAT, F.; PELLET, M-P.; SINGH, V.P.; THIAUCOURT, F. A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. **Mol. Cell. Probes**, v. 21, p. 391–399, 2007.