

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

POLIMORFISMO DO GENE GOLA-DRB.2 E DETECÇÃO DE *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster EM REBANHOS CAPRINOS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA, BRASIL

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

**RECIFE - PE
FEVEREIRO DE 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

POLIMORFISMO DO GENE GOLA-DRB.2 E DETECÇÃO DE *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster EM REBANHOS CAPRINOS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA, BRASIL

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

Tese apresentada ao programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia.

**RECIFE - PE
FEVEREIRO DE 2017**

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

POLIMORFISMO DO GENE GOLA-DRB.2 E DETECÇÃO DE
Mycoplasma agalactiae e *Mycoplasma mycoides* cluster EM
REBANHOS CAPRINOS NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E
PARAÍBA, BRASIL

Tese apresentada ao programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa

Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva

Prof. Dr. Kleber Régis Santoro

RECIFE - PE
FEVEREIRO DE 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V698p

Vilaça, Luciana Florêncio

Polimorfismo do gene GOLA-DRB.2 e detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil / Luciana Florêncio Vilaça. – 2017.

83 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba, Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. Agalactia contagiosa 2. Complexo principal de histocompatibilidade 3. DRB|PstI 4. DRB|TaqI 5. MHC 6. *Mycoplasma agalactiae* 7. *Mycoplasma mycoides* cluster I. Barbosa, Severino Benone Paes, orient. II. Título

CDD 636

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA

Tese intitulada “Polimorfismo do gene GoLA-DRB.2 e detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil”.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017

Profa. Dra. Angelina Bossi Fraga – UFAL

Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva – UFRPE/UAG

Profa. Dra. Lúcia Helena de Albuquerque Brasil - UFRPE

Profa. Dra. Maria de Mascena Diniz Maia - UFRPE

Profa. Dr. Severino Benone Paes Barbosa - UFRPE
(Orientador)

RECIFE - PE
FEVEREIRO DE 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA FLORÊNCIO VILAÇA - nascida em 15 de janeiro de 1987, natural de Recife – PE, filha de Geraldo Vilaça e Janecy Florencio Vilaça, iniciou o curso de graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns no ano de 2005. Em julho de 2010 concluiu a graduação. Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, área de concentração Produção Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns, concluindo em agosto de 2012. Em março de 2013, ingressou no Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia – PDIZ, área de concentração Produção Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Em setembro de 2014 assumiu o cargo de Professora substituta da disciplina Genética Básica e Biotecnologia na Universidade Federal Rural do Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns, concluindo em março de 2015.

Aos meus pais e irmão, pela capacidade de acreditar e investir em mim, pelo cuidado e dedicação, principalmente nos momentos de incerteza.

Ao meu esposo Eduardo pela sua presença e constante incentivo.

A vocês, os méritos dessa conquista.

Dedico

AGRADECIMENTO

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar forças para seguir em frente sem desanimar com as dificuldades.

Em especial, à minha família pelo apoio e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas.

Ao professor Benone pela orientação e por ter acolhido o meu projeto de pesquisa, oferecendo condições acadêmicas para o seu desenvolvimento.

À professora e amiga Elizabete (Bete), o meu muito obrigada. Sinto-me muito privilegiada pela convivência com uma profissional tão dedicada, competente, incentivadora e sempre pronta a ajudar.

Ao Professor Kleber Régis, pelo apoio, incentivo e disponibilidade ao longo da minha vida acadêmica.

Ao PDIZ e aos professores da pós-graduação, pela fundamental participação na minha formação.

Aos colegas da pós-graduação, pelos momentos compartilhados e troca de experiências, em especial às amigas Janaína e Janiele pela companhia, conversas e conselhos, e por tornarem meus dias em Recife mais felizes. À colega Christina pelo apoio nas coletas dos dados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (Welligton, Maíra, Claudianny e Edyjoelson), pela convivência e auxílio na condução do experimento. Em especial, à Elizabete pelo apoio no laboratório, pela leitura e preciosas correções.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) de Sertânia, aos produtores Gilson e Edgar, e à Fazenda Carnaúba pela disponibilidade, hospitalidade e acesso aos animais e aos dados.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FACEPE pela concessão da Bolsa de estudos e financiamento do projeto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO GERAL.....	11
ABSTRACT	13
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
CAPÍTULO I.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2 AGALAXIA CONTAGIOSA EM CAPRINOS LEITEIROS.....	20
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>MYCOPLASMA</i>	21
2.2 ESPÉCIES DE <i>MYCOPLASMA</i> CAUSADORAS DE AGALAXIA CONTAGIOSA EM CABRAS	22
2.3 FREQUÊNCIAS DOS AGENTES ETIOLÓGICOS	24
2.4 DIAGNÓSTICO	26
3 RESISTÊNCIA GENÉTICAS ÀS DOENÇAS.....	28
3.1 RESISTÊNCIA À MASTITE	29
3.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	30
3.2.1 GENE GOLA (<i>GOAT LYMPHOCYTE ANTIGEN</i>)	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
3. RESULTADOS	51
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES.....	60
6. COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	60
7. AGRADECIMENTOS.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CAPÍTULO III.....	65
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAL E MÉTODOS	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES.....	80
AGRADECIMENTOS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

	Página
Tabela 1. Evolução dos estudos voltados a identificação de polimorfismos do gene GoLA em caprinos.....	32

Capítulo II

	Página
Tabela 1. Número de amostras (N) por padrão racial e origem das populações estudadas	48
Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de amostras de leite positivas para <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Mycoplasma agalactiae</i> e <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster em cabras pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.....	52
Tabela 3. Análise de qui-quadrado dos fatores de risco padrão racial e sistema de criação em cabras pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.....	53
Tabela 4. Frequência absoluta e relativa de amostras de leite positivas para <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Mycoplasma agalactiae</i> e <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster, de acordo com o padrão racial de cabras pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba.....	54
Tabela 5. Comparação entre médias de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite de cabras positivas e negativas pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba.....	55

Capítulo III

	Página
Tabela 1. Número de amostras (N) por padrão racial e origem das populações estudadas.....	69
Tabela 2. Genótipos obtidos por PCR-RFLP do segundo éxon do gene GoLA-DRB.2.....	70
Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas da população total de cabras leiteiras.....	73
Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas em cabras leiteiras de diferentes padrões raciais.....	74
Tabela 5. Frequências dos haplótipos em cabras leiteiras de diferentes padrões raciais.....	75
Tabela 6. Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), equilíbrio de Hardy-Weinberg em cabras leiteiras de diferentes padrões raciais.....	76
Tabela 7. Análises de variância molecular e estatísticas de Wrigth nos padrões raciais.....	78
Tabela 8. Valores médios das características de composição e contagem de células somáticas (CCS) por genótipo em cabras leiteiras.....	79
Tabela 9. Valores médios das características de composição e contagem de células somáticas (CCS) por haplótipo em cabras leiteiras.....	79

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Página

<p>Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2%. (a) Produtos de PCR do gene GoLA-DRB3 (285 pb); (b) Mesmas amostras após digestão com a enzima de restrição PstI.....</p>	33
---	----

Capítulo II

Página

<p>Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR genérica, PCR do controle interno, PCR específica para <i>Mycoplasma agalactiae</i> e para <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster. 1: padrão de peso molecular; 2: <i>Mycoplasma</i> spp. (controle positivo); 3: <i>Mycoplasma agalactiae</i> (controle positivo); 4: <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster (controle positivo); 5 e 6: amostras positivas para <i>Mycoplasma</i> spp. e GAPDH; 7 e 8: amostras positivas para <i>Mycoplasma agalactiae</i>; 9 e 10: amostras positivas para <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster.....</p>	51
---	----

Capítulo III

Página

<p>Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos pela PCR (<i>primers</i> DRB 1.1/DRB 1.2) da região do éxon 2 do gene DRB.2 em cabras leiteiras. 1: padrão de peso molecular de DNA 100pb; 2 a 8: amostras GoLA-DRB.2.....</p>	71
---	----

<p>Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão com as enzimas <i>PstI</i> e <i>TaqI</i> do gene DRB3.2 em cabras leiteiras. 1 e 8: padrão de peso molecular de DNA 100pb; 2 a 7: amostras digeridas com <i>PstI</i>; 9 a 14: amostras digeridas com <i>TaqI</i>.....</p>	72
--	----

RESUMO GERAL

VILAÇA, Luciana Florêncio. **Polimorfismo do gene GoLA-DRB.2 e detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.** 2017. 83p. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE¹.

O programa de seleção de caprinos com aptidão leiteira tem sido, basicamente, voltado ao aumento na quantidade de leite, negligenciando fatores relacionados à resistência a doenças e à composição do leite. Este comportamento vem ocasionando o direcionamento a estudos voltados à rápida detecção de micro-organismos e à identificação de genes ou regiões cromossômicas relacionadas a doenças infectocontagiosas da glândula mamária. Diante do exposto, a presente tese teve como objetivo inicial, detectar *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) e *Mycoplasma mycoides* cluster (*Mm_{cluster}*) em amostras de leite caprino e avaliar a composição e a contagem de células somáticas provenientes de animais positivos para *Ma* e *Mm_{cluster}* (Experimento 1). Além disso, buscou-se identificar os polimorfismos do gene *Goat Lymphocyte Antigen* (GoLA-DRB.2) e associar com características do leite de cabra (Experimento 2). Para realização do Experimento 1, foram colhidas 373 amostras de leite de caprinos de diferentes raças pertencentes a rebanhos localizados nos estados de Pernambuco e da Paraíba. O DNA genômico das amostras de leite foi extraído pelo método sílica/isotiocianato de guanidina, seguida da amplificação genérica e espécie-específica por reação em cadeia da polimerase. A identificação da presença ou não de produtos gênicos foi realizada através de observação direta das bandas dos produtos de PCR visualizados em gel de eletroforese. Análises de variância e testes de comparação de médias foram realizados para verificar os efeitos da positividade sobre as características de composição e contagem de células somáticas. As frequências para *Ma* e *Mm_{cluster}* foram de 43,21% e 5,70%, nos rebanhos avaliados, respectivamente. Foram considerados fatores de risco o sistema de criação ($p < 0,001$) e o padrão racial ($p < 0,001$). Em todos os grupos genéticos foram detectadas amostras positivas para *Ma*, sendo observada maior ocorrência na raça Marota. Amostras positivas para *Mm_{cluster}* só foram observadas em animais das raças Moxotó (18,28%), Parda Sertaneja (1,92%) e SPRD (3,12%). No estudo de associação entre a positividade e composição do leite, observou-se diferença estatística para as médias de proteína, caseína e contagem de células somáticas. A detecção de *Mycoplasma* em amostras de leite caprino sugere a introdução de animais infectados nos rebanhos avaliados, como também o possível contato com os agentes etiológicos em feiras e exposições. Além disso, o sistema de criação adotado na propriedade influencia a disseminação da infecção no rebanho. Para execução do Experimento 2, um total de 181 fêmeas caprinas de diferentes raças provenientes do estado de Pernambuco e da Paraíba foram selecionadas. Amostras de leite foram colhidas e submetidas à extração do DNA genômico como descrito no Experimento 1. A genotipagem dos animais para o fragmento de 285 pb do gene GoLA-DRB.2 foi resultante da amplificação pela técnica de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição *PstI* e *TaqI*. A frequência alélica encontrada para a população total com a utilização da enzima *PstI* foi de A igual a 0,7254 e B a 0,2746, sendo as frequências dos

genótipos AA, AB e BB de 0,6740, 0,0387 e 0,2873, respectivamente. As frequências alélicas obtidas a partir da digestão com a enzima *TaqI* foi de C = 0,8149 e D = 0,1851, sendo as frequências dos genótipos: 0,7403 (CC), 0,1492 (CD) e 0,1105 (DD), com predominância do genótipo CC em todos os padrões raciais avaliados. Os valores da Heterozigosidade observada foram menores do que os encontrado para Heterozigosidade esperada em todas as populações testadas, com rebanhos fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve variação genética significativa entre raças, entre indivíduos da mesma raça e dentro da população. Não houve diferença significativa entre os genótipos e os padrões de haplótipos sobre os valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína e contagem de células somáticas. O gene GoLA-DRB.2 foi polimórfico na avaliação com as enzimas *PstI* e *TaqI* estudadas, mas não desempenhou efeitos sobre nenhuma das características de composição e contagem de células somáticas avaliadas.

Palavras-Chaves: Agalactia contagiosa; Complexo Principal de Histocompatibilidade; DRB1PstI; DRB1TaqI; MHC; *Mycoplasma agalactiae*; *Mycoplasma mycoides* cluster.

¹Comitê Orientador: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa – UFRPE (orientador); Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva – UAG/UFRPE (co-orientadora); Prof. Dr. Kleber Régis Santoro – UAG/UFRPE (co-orientador).

ABSTRACT

VILAÇA, Luciana Florêncio. **Polymorphism of the GoLA-DRB.2 gene and detection of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* cluster in goat herds in the states of Pernambuco and Paraíba, Brazil.** 2012. 83p. Thesis (Integrated PhD in Animal Science) - University Federal Rural of Pernambuco.

The program of selection of goats with milk aptitude has been focused on the increase in milk quantity, neglecting factors related to resistance to diseases and milk composition. This behavior has led to studies aimed at the rapid detection of microorganisms and the identification of genes or chromosomal regions related to infectious diseases of the mammary gland. The objective of the present thesis was to detect *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) and *Mycoplasma mycoides* cluster (*Mm_{cluster}*) in goat milk samples and to evaluate the composition and counting of somatic cells from *Ma* and *Mm_{cluster}* positive animals (Experiment 1). In addition, we sought to identify Goat Lymphocyte Antigen (GoLA-DRB.2) gene polymorphisms and to associate them with goat milk characteristics (Experiment 2). To perform the experiment 1, 373 samples of goat milk of different races belonging to herds located in the states of Pernambuco and Paraíba were collected. The genomic DNA of the milk samples was extracted by the silica / guanidine isothiocyanate method, followed by the generic and species-specific amplification by polymerase chain reaction. Identification of the presence or absence of gene products was performed by direct observation of the bands of the PCR products visualized on electrophoresis gel. Analysis of variance and comparison tests of averages were performed to verify the effects of positivity on somatic cell composition and counting characteristics. The frequencies for *Ma* and *Mm_{cluster}* were 43.21% and 5.70%, respectively, in the herds evaluated. The breeding system was considered as risk factors ($p < 0.001$) and the racial pattern ($p < 0.001$). *Ma* positive samples were detected in all genetic groups, with higher occurrence in the and Marota race. Positive samples for *Mm_{cluster}* were only observed in Moxotó (18.28%), Parda Sertaneja (1.92%) and SPRD (3.12%) rats. In the study of association between positivity and milk composition, a statistical difference was observed for protein, casein and somatic cell counts. The detection of *Mycoplasma* in samples of goat milk suggests the introduction of infected animals in the evaluated herds, as well as the possible contact with the etiological agents in fairs and exhibitions. In addition, the breeding system adopted on the property influences the spread of the infection in the herd. For the execution of Experiment 2, a total of 181 female goats of different races from the state of Pernambuco and Paraíba were selected. Milk samples were harvested and extracted from genomic DNA as described in Experiment 1. The genotyping of the animals for the 285bp fragment of the GoLA-DRB.2 gene was the result of amplification by PCR-RFLP technique, using the enzymes of Restriction *PstI* and *TaqI*. The allelic frequency found for the total population using the *PstI* enzyme was A equal to 0.7254 and B at 0.2746, with the frequencies of the AA, AB and BB genotypes being 0.6740, 0.0387 and 0, 2873 respectively. The allele frequencies obtained from the

digestion with the TaqI enzyme were $C = 0.8149$ and $D = 0.1851$, with the frequencies of the genotypes: 0.7403 (CC), 0.1492 (CD) and 0.1105 (DD), with predominance of the CC genotype in all the racial standards evaluated. The observed Heterozygosity values were lower than those found for expected Heterozygosity in all tested populations with herds out of Hardy-Weinberg equilibrium. There was significant genetic variation between races, among individuals of the same race and within the population. There was no significant difference between genotypes and haplotype patterns on the values of fat, protein, lactose, total solids, casein and somatic cell counts. The GoLA-DRB.2 gene was polymorphic in the evaluation with the PstI and TaqI enzymes studied but had no effect on any of the somatic cell composition and counting characteristics evaluated.

Keywords: Agalactia contagiosa; DRB|PstI; DRB|TaqI; *Mycoplasma agalactiae*; *Mycoplasma mycoides* cluster; Principal Histocompatibility Complex.

¹Comitê Orientador: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa – UFRPE (orientador); Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva – UAG/UFRPE (co-orientadora); Prof. Dr. Kleber Régis Santoro – UAG/UFRPE (co-orientador).

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A caprinocultura no Brasil vem se consolidando como atividade rentável, conquistando novos mercados para o leite de cabra e seus derivados e despertando o interesse de muitos produtores rurais. Tem sido uma alternativa viável para a agricultura familiar, proporcionando aumento no efetivo total de caprinos e na produção de leite de cabra, contribuindo para ascensão da atividade e a sua importância na contribuição do desenvolvimento socioeconômico do país.

Apesar dessa ascensão, tem-se verificado diversos fatores que tem dificultado o fortalecimento da cadeia produtiva caprina, demonstrando a necessidade de aperfeiçoamento, a fim de minimizar as limitações existentes para que se possa manter a sustentabilidade e competitividade do setor. São inúmeros os fatores que podem vir a interferir sobre a produção de leite caprino, dentre eles podem-se destacar problemas relacionados a práticas inadequadas de higiene, alimentação e manejo, fatores genéticos, limitações tecnológicas, dificuldade na adoção de medidas sanitárias profiláticas ocasionando surgimento de enfermidades, dentre outros.

Na tentativa de solucionar tais problemas, torna-se fator determinante a identificação dos micro-organismos que causam infecção na glândula mamária, tanto para a adoção de métodos de controle e prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos. Além disso, a identificação de genes ou regiões cromossômicas relacionadas a susceptibilidade a doenças infectocontagiosas da glândula mamária, torna-se fundamental para identificação de animais geneticamente superiores e obtenção de produtos com melhor qualidade e segurança alimentar. Assim, faz-se de grande importância estudos que estejam voltados para o incremento da produção do leite de cabra através da utilização de tecnologias que visem a prevenção de doenças, a seleção de animais mais resistentes e a qualidade do leite e de seus produtos.

Considerando tais necessidades, a presente tese é composta por três capítulos, sendo o Capítulo I uma revisão de literatura acerca da agalaxia contagiosa em caprinos leiteiros, seus principais agentes etiológicos e características, um panorama sobre a situação da pesquisa mundial e os principais métodos de diagnóstico. Esse capítulo apresenta ainda informações sobre a resistência a doenças, com destaque para a mastite em caprinos e sua associação com genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade. É seguido pelo segundo capítulo, que tem como título “Detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil”, cujo objetivo foi a detecção dos principais agentes etiológicos da agalaxia contagiosa em caprinos, bem como avaliar a composição e a contagem de células somáticas em amostras de leite provenientes de animais positivos, fornecendo informações para a adoção de métodos de controle, prevenção e monitoramento dos rebanhos. O capítulo III, intitulado “Diversidade genética do gene GoLA-

DRB.2 em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil”, identifica e associa os polimorfismos do gene GoLA-DRB.2 em diferentes raças caprinas e busca sua associação com características de composição e contagem de células somáticas, sendo esta fundamental para identificação de animais geneticamente superiores e obtenção de produtos com melhor qualidade e segurança alimentar.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

Polimorfismo do gene GoLA-DRB.2 e detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster

Polimorfismo do gene GoLA-DRB.2 e detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster

1. INTRODUÇÃO

A escassa produção de trabalhos voltados à obtenção de leite de cabra de qualidade e a dificuldade no desenvolvimento de um programa de melhoramento genético caprino eficaz têm causado limitações em atender às necessidades do consumidor, que busca um produto com alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, reduzida contagem de células somáticas (CCS) e baixa carga microbiana (Jaubert, 1997; Fonseca & Santos, 2000).

O controle microbiológico está ligado à sanidade do sistema mamário, indicado pela CCS e à qualidade higiênica praticada na propriedade leiteira (Correa et al., 2010; Melo, 2012). A maioria dos estudos genéticos focados em leite utiliza a CCS como medida fenotípica para indicar a presença de bactérias no úbere (Rupp & Boichard, 2003). Isso porque o leite é um excelente meio para crescimento e suporte de agentes patogênicos, podendo ser originários de contaminação pós-ordenha ou de infecções intramamárias (Nicoletti, 1987). Dentre as doenças que mais afetam a qualidade do leite e a mais importante em termos econômicos é a mastite.

A mastite é a doença endêmica de maior prevalência em rebanhos leiteiros e considerada a mais importante causa de perdas econômicas, tanto para o produtor, quanto para a indústria leiteira. Pode ser definida como sendo uma inflamação da glândula mamária caracterizada por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite, e por distúrbios patológicos do tecido glandular (Germano & Germano, 1995; Dias, 2007; Peixoto et al., 2013).

É importante destacar a importância da mastite para a saúde pública, uma vez que leite e derivados provenientes de animais com mastite poderão veicular bactérias altamente patogênicas e resíduos de antibióticos (Corrales et al., 1995; Cardoso et al., 2000). Os patógenos usualmente relacionados com esta enfermidade em cabras pertencem aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Mycoplasma* (Langoni et al., 2006; Mota, 2008; Dal Pozzo et al., 2011).

A agalaxia contagiosa (AC) em caprinos, causada por bactérias do gênero *Mycoplasma*, tem desencadeado um aumento significativo da CCS, sendo considerada uma importante causa de mastite em áreas endêmicas (Corrales et al. 2004). Além disso, tem

provocado grande impacto na economia por ocasionar uma redução abrupta da produção de leite, principalmente em regiões em que esta se caracteriza como única fonte de renda.

Nos últimos anos, a agalaxia contagiosa e seus principais agentes etiológicos têm despertando preocupação e interesse por parte dos produtores rurais e pesquisadores (Bandeira et al., 2008; Santos et al., 2012; Alves et al., 2013; Santos et al., 2015), isso porque o controle microbiológico dessa infecção está diretamente ligado à sanidade do sistema mamário, e a identificação dos agentes etiológicos é de extrema importância, tanto para a adoção de métodos de controle e prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos (Brito & Brito, 1998). Informações sobre os aspectos epidemiológicos, as manifestações clínicas e as medidas de controle e profilaxia das micoplasmoses são indispensáveis para tornar possível a eliminação de portadores desses agentes infecciosos (Oliveira et al., 2004). Além disso, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular da agalaxia contagiosa, através da identificação de seus agentes etiológicos, começa a esclarecer aspectos epidemiológicos, permitindo estratégias eficazes na prevenção, diagnóstico e controle da doença (Gómez-Martín et al., 2015).

O rápido diagnóstico e a diminuição dos impactos causados pela mastite é uma busca constante de todos os setores envolvidos na cadeia produtiva, não somente nos aspectos econômicos, mas também porque os animais que apresentam maior resistência a essa enfermidade fornecerão produtos de melhor qualidade e por mais tempo. Com esse intuito, tem-se dedicado grande atenção na identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência a doenças, de modo a selecionar concomitantemente animais produtivos e resistentes (Mota, 2003).

Uma região do genoma caprino que está associado à mastite é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), formado por um complexo de genes que desempenham importante papel no sistema imunológico dos animais e que na espécie caprina foi denominado de região GoLA (*Goat Lymphocyte Antigen*) (Baghizadeh et al., 2009; Zhao et al., 2011). Esta região apresenta um elevado polimorfismo e tem recebido destaque nos estudos sobre a resposta imunológica dos indivíduos aos agentes infecciosos (Amills et al., 1996; Schaschl et al., 2004; Baghizadeh et al., 2009; Paracha et al., 2015). No entanto, ao contrário do observado nos estudos com vacas, a pesquisa sobre a genética da resistência em cabras leiteiras ainda é incipiente e pouco se sabe sobre a associação entre os alelos do gene GoLA-DRB.2 com a resistência às doenças e características de produção em cabras.

A fim de atender esse objetivo, se faz necessário um maior conhecimento sobre essa problemática. Assim, esta revisão de literatura tem como objetivo fazer uma abordagem inicial acerca de informações referentes à agalaxia contagiosa em caprinos leiteiros, seus

principais agentes etiológicos e principais métodos de diagnóstico. Apresenta ainda uma breve explanação sobre a resistência a doenças, o Complexo Principal de Histocompatibilidade, com ênfase no que se refere ao gene candidato GoLA-DRB.2 em caprinos.

2 AGALAXIA CONTAGIOSA EM CAPRINOS LEITEIROS

A agalaxia contagiosa é uma das principais enfermidades infecciosas dos pequenos ruminantes. Esta doença apresenta caráter agudo com tendência à cronicidade que causa prejuízos econômicos significativos aos criadores (Santos et al., 2015). É caracterizada pelo aparecimento de inflamações localizadas na glândula mamária, nas articulações e nos olhos dos animais, sintomas esses conhecidos como a tríade clássica da doença (Ribeiro, 1997; Alcântara et al., 2013).

Segundo “World Organization for Animal Health” – OIE (2008), a agalaxia contagiosa é reconhecida mundialmente como causadora de perdas econômicas devido, principalmente, à morte de crias e à redução ou parada da produção de leite, estando comumente relacionada com casos de mastite e se caracterizando como um sério problema em termos de impactos socioeconômicos e de saúde animal.

A glândula mamária é o principal órgão afetado pela agalaxia contagiosa (Nicholas et al., 2008). A diminuição drástica da produção de leite verificada em animais que apresentam esta doença, as alterações na coloração do leite, podendo variar desde claro (aquoso) a amarronzado, o aspecto de soro sanguíneo com presença de grumos, torna o leite impróprio para o consumo e inadequado para a indústria láctea afetando diretamente os pequenos produtores que não têm recursos financeiros para substituir o plantel ou para implementar procedimentos de controle (Contreras et al., 2003; Bidhendi et al., 2011). Almeida et al. (2013) verificaram que alguns rebanhos com agentes causadores de mastite não atenderam aos padrões físico-químicos do leite de cabra no Rio de Janeiro e em Minas Gerais.

Os micro-organismos causadores de agalaxia contagiosa em caprinos podem instalar-se também nas articulações do animal afetado, ocasionando artrite/poliartrite, e nos olhos, causando lesões oculares que começam com conjuntivite e congestão da mucosa conjuntival, lacrimejamento e fotofobia, seguida por vascularização da córnea e, em casos

graves, podem levar à cegueira (Madanat et al., 2001; Nicholas et al., 2008; Marinho, 2008).

É importante destacar ainda que o principal reservatório dos micoplasmas é o animal infectado, sendo a transmissão pelo contato direto (saliva, secreções nasais ou oculares, leite, fezes, urina ou excreções de lesões articulares) e pela ingestão da bactéria em alimentos e água contaminados por secreções ou excreções de animais portadores, permitindo a rápida disseminação da infecção entre e dentre os rebanhos (Bergonieret al., 1997; Marinho, 2008).

2.1 Características gerais do gênero *Mycoplasma*

A agalaxia contagiosa é caracterizada por uma síndrome infecciosa grave, sendo causada por micro-organismos do gênero *Mycoplasma*. Os micoplasmas são considerados os menores organismos procarióticos de vida livre, possuem genomas de tamanho bastante reduzido (inferior a 600 kb), são auto-replicantes (células com o mínimo necessário para sua multiplicação: membrana citoplasmática, ribossomos e DNA) e se diferencia de outras bactérias por seu tamanho diminuto (0,3 a 0,8 μm) e pela ausência total de parede celular rígida (Varela, 2010; Santos et al., 2012; Santos et al., 2015).

A ausência de parede celular diferencia e inclui os micoplasmas na classe *Mollicutes* (do latino *mollis*, delicado e *cutis*, parede), pertencente à ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma* (Tully et al., 1993; Walker, 2003).

Esses organismos são desprovidos de muitos genes e, conseqüentemente, carecem de muitas vias enzimáticas básicas. No entanto, apesar das suas capacidades metabólicas relativamente limitadas, essas bactérias possuem uma maquinaria metabólica suficiente para o crescimento celular, para a fuga às defesas imunitárias e, por vezes, para a sobrevivência no hospedeiro por períodos indefinidos (Varela, 2010). Além disso, alguns de seus antígenos reagem cruzadamente com antígenos dos tecidos do hospedeiro, o que permite aos micoplasmas o estabelecimento de infecções persistentes, uma vez que o sistema imunológico do hospedeiro não o reconhece (Quinn et al., 2007).

Dessa forma, essas bactérias apresentam mecanismos que interagem com o sistema imune do hospedeiro, um atributo essencial à patogenicidade. Esses mecanismos permitem a sua replicação, transferência e a colonização de novos hospedeiros (Razin et al., 1998; Rottem, 2003). Associado a esse fato, possuem a capacidade de aderir às células

hospedeiras, o que facilita a lesão da célula-alvo e permite a troca de componentes metabólicos (Fleury et al., 2002).

Outra característica importante dos micoplasmas é a exigência de meios enriquecidos para o cultivo em meios artificiais, contendo proteínas animais, um componente esterol e uma fonte de DNA ou de adenina dinucleotídeo (Quinn et al., 2007). Em meios sólidos, formam microcolônias típicas (50 a 500 μm), reconhecidas pela sua aparência de “ovo frito” sob luz transmitida; essa particularidade é observada uma vez que as bactérias penetram no meio tornando a região mais escura (Quinn et al., 2007; Marques, 2009).

2.2 Espécies de *Mycoplasma* causadoras de agalaxia contagiosa em cabras

Os principais agentes etiológicos de agalaxia contagiosa em cabras são *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Gómez-Martín et al., 2015). Outras espécies de micoplasmas também vêm sendo relacionadas com a doença, como *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* e *Mycoplasma putrefaciens*, sendo estes responsáveis por determinar diferentes graus de gravidade da infecção (Corrales et al., 2004; Câmara et al., 2015).

a) *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*)

Ma é uma bactéria polimórfica com o tamanho de 124-250 nm, um pequeno genoma sequenciado totalmente (1×10^9 Da) apresentando 877.438 pb (Sirand-Pugnet et al., 2007; Kumar et al., 2014). Apresenta baixo teor de GC (29,7 mol%), sendo este ligeiramente superior ao dos outros micoplasmas da classe *Mollicutes* (Nicholas et al., 2008). O seu genoma possui 34 genes de tRNA, dois conjuntos (quase idênticos) de genes rRNA com dois operons 16S-23S e dois 5S agrupados em dois loci separados por 400pb (Nicholas et al., 2008).

Essa espécie é relativamente estável à temperatura ambiente, mais sensível à alta temperatura, sendo facilmente inativada sob exposição a 60°C durante cinco minutos (Castro-Alonso et al., 2010; Kumar et al., 2014).

O período de incubação do *Ma* em cabras é de oito semanas, dependendo da quantidade de micro-organismo, virulência do agente infeccioso e da resistência do hospedeiro (Marinho, 2008; Silva et al., 2013). Os principais sintomas da infecção por esse agente são: depressão, perda de apetite, anorexia, seguido por queda brusca da produção de

leite, mastite, agalaxia, poliartrite, principalmente nas articulações do carpo, e tarso, podendo ser verificados ainda pneumonia e aborto em animais cronicamente afetados (Azevedo et al., 2006; Silva et al., 2014).

É considerado o principal agente etiológico da agalaxia contagiosa em caprinos, sendo responsável por 90% de todos os surtos nesses animais (Alves et al., 2013; Kumar et al., 2014). Apesar do grande impacto causado por casos de agalaxia contagiosa e de relatos de *Ma* nos rebanhos do país, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para diagnóstico e eliminação do agente do rebanho caprino nacional. Casos de agalaxia contagiosa por *Ma* foram relatados nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Azevedo et al., 2006; Bandeira et al., 2008; Alves et al., 2013).

A descrição da sequência genômica de *Ma* (Sirand-Pugnet et al. 2007) permitiu o desenvolvimento de métodos que podem contribuir para a detecção rápida e o controle eficaz do agente. Vários trabalhos têm sido realizados com o intuito de comparar o método tradicional de diagnóstico, cultura bacteriológica (lactocultura) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo observada superioridade deste último, como um método simples e rápido na detecção de *Ma*, e responsável por reduzir o tempo necessário para o diagnóstico (Tola et al., 1997; Bandeira et al., 2008; De La Fe et al., 2010; Santos et al., 2012).

b) *Mycoplasma mycoides* cluster (*Mm*_{cluster})

Mycoplasma mycoides cluster se caracteriza economicamente como as espécies mais relevantes, uma vez que causam uma série de enfermidades em bovinos, caprinos e ovinos (OIE, 2008). No entanto, poucos trabalhos detectaram a presença de espécies deste grupo no Brasil (Nascimento et al., 1986; Barbosa et al., 2000).

Esse grupo consiste em cinco espécies e subespécies de micoplasmas que compartilham muitas características genótípicas e fenotípicas (Wang et al., 2014): *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides small colony* (*MmmSC*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) e sorogrupo bovino 7 (*Msp7-PG50*) (Kumar et al., 2013; Wang et al., 2014). Estas estão estreitamente relacionadas em suas características bioquímicas e sorológicas e na filogenia do gene 16S rRNA (Santos et al., 2009; Santos et al., 2012).

Mmc e *Mcc* tem sido alvo de maior quantidade de estudos uma vez que estão sendo associados com a agalaxia contagiosa especialmente em caprinos (Szeredi et al., 2003; Santos et al., 2015).

i. Mycoplasma mycoides subsp. capri (Mmc)

Mmc consiste na reclassificação, em função da relação filogenética, de duas subespécies anteriormente consideradas distintas: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides large colony* (LC) e *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Manso-silvan et al., 2009; Shahram et al., 2010).

Além de afetar principalmente cabras, *Mmc* tem uma das mais amplas distribuioes geográficas dos micoplasmas de ruminantes, sendo encontrado em todos os continentes, onde pequenos ruminantes são criados (OIE, 2008).

Em caprinos, o *Mmc* provoca um padrão de doenças referida como "síndrome MAKePS" – mastite-artrite-keratoconjuntivite e pneumonia-septicemia (Thiaucourt & Bolske, 1996; OIE, 2008), que resulta em sérias perdas economicas nos sistemas de produao. No entanto, a falta de serviços de diagnóstico para doenças causadas por micoplasmas faz sua presença muitas vezes passar despercebida.

Em estudo realizado por Amores et al. (2012), foi detectado *Mmc* utilizando a reaao em cadeia da polimerase (PCR) a partir de leite do tanque coletado de cabras que apresentavam sinais clínicos de mastite em uma área com agalaxia contagiosa endêmica. Kumar et al. (2013) coletaram amostras de leite de 171 cabras em cinco diferentes rebanhos na ndia e relataram o isolamento de *Mmc* e associaao da mastite devido  infecao por esse agente.

ii. Mycoplasma capricolum subsp. capricolum (Mcc)

Mcc está amplamente distribuído e  o agente patognico principal em cabras, mas também tem sido encontrado em ovelhas e vacas, sendo de alta patogenicidade, responsável por causar alta morbidade e mortalidade (Da Massa et al., 1992).

Os principais sinais clínicos são febre, septicemia, mastite e artrite severa, podendo evoluir rapidamente para o bito (Nicholas et al., 2008).

2.3 Frequências dos agentes etiológicos

A agalaxia contagiosa foi primeiramente descrita na Itália em 1916 (Madanat et al., 2001). Em estudo realizado por Zendulkova et al. (2007) para a detecao de *Ma* em rebanhos ovinos e caprinos na Jordânia, foi verificado que a prevalência foi três vezes maior

em caprinos do que em ovinos (85% e 36,6%, respectivamente). Bidhendi et al. (2011) avaliando 271 ovelhas e 96 cabras, relatou a presença de *Ma* em amostras de leite na província do Curdistão no Irã. Isolados de *Ma* de cabras iranianas foram testados por Kheirkhah et al. (2013) que avaliaram cepa vacinal testada para esse patógeno e observaram uma fraca homologia com a cepa patogênica detectada em rebanhos caprinos. Em estudo realizado por Ariza-Miguel et al. (2012) na Espanha, *Ma* foi a única espécie detectada, embora *Mmc* tenha sido relatada anteriormente (Al-Momani et al., 2011). A ocorrência de *Mmc* também foi observada por Szeredi et al. (2003), Amores et al. (2012) e Kumar et al. (2013) na Hungria, Jordânia e Índia, respectivamente. Na Nigéria, Akwuobu et al. (2014) identificaram a presença das espécies *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma arginini* e *Mmc*.

A presença de *Ma* na glândula mamária foi associada com alterações em CCS e características físico-química do leite caprino. Corrales et al. (2004) e Contreras et al. (2008) associaram valores elevados de CCS como indicativo de *Ma* em amostras individuais de leite e amostras de tanque em cabras, respectivamente.

No Brasil, o primeiro relato de agalaxia contagiosa foi registrado por Penha & D'Apice em São Paulo em 1942, onde foi verificado um surto de pneumonia em cabritos e de mastite em cabras (Penha & D'Apice, 1942). Posteriormente, casos de agalaxia contagiosa foram relatados por Barbosa et al. (2000) no estado do Rio de Janeiro, verificando ocorrência de *Mycoplasma* spp. em todas as amostras do conduto auditivo externo dos caprinos avaliadas, e destas, 80% (16/20) foram positivos para *Mycoplasma mycoides*. Azevedo et al. (2006), nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte avaliaram caprinos das raças Saanen, Toggenburg e Anglo Nubiana adquiridos para produção de leite, com frequência variando de 26,1% a 100% nas cabras e de 36,5% a 100% em cabritos. Bandeira et al. (2008) observaram a ocorrência de *Ma* em 20% das propriedades e 7,5% dos animais estudados em 30 rebanhos caprinos de 15 municípios do estado da Paraíba. Na região semiárida do estado de Pernambuco, Alves et al. (2013) verificaram a ocorrência de *Ma* em 29,6% do sêmen congelado avaliado e em 3,7% das amostras de leite de caprinos naturalmente infectados. Em estudo realizado no estado de Sergipe, Santos et al. (2015) realizaram um levantamento preliminar da doença em caprinos e ovinos, utilizando 12 amostras de leite e 194 soros, sendo que todas as amostras de leite foram negativas por PCR, mas o ensaio imunoenzimático (ELISA) revelou que 20 animais (10,3%) apresentaram anticorpos circulantes, indicando que os animais tiveram contato com o agente etiológico causador da agalaxia contagiosa, podendo ser fonte de infecção.

2.4 Diagnóstico

Quando um rebanho é severamente infectado, o diagnóstico pode ser estabelecido pela observação dos animais clinicamente afetados, apresentando três principais sinais: mastite, artrite e ceratoconjuntivite (Alcântara et al., 2013).

O diagnóstico laboratorial é o único meio de confirmação da doença. Este pode ser realizado pelo isolamento e identificação dos agentes etiológicos em meios específicos, pelo diagnóstico indireto através da pesquisa de anticorpos circulantes, utilizando ensaios imunoenzimáticos e pela detecção de fragmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia de polimerase (PCR) (Azevedo et al., 2006; Campos et al., 2009; Ariza-Miguel et al., 2012).

Normalmente, o cultivo e identificação dos agentes em material clínico de animais comprometidos, como o muco vaginal ou prepucial, sêmen e leite é realizado em laboratório especializado (Albuquerque, 2008). No entanto, apesar da importância do diagnóstico rápido em casos de mastite causada por espécies de *Mycoplasma*, os protocolos microbiológicos (padrão ouro) requerem intervalos maiores que 10 a 14 dias, devido aos fatores de crescimento exigidos por esse patógeno, além de apresentar resultados que, por vezes, são difíceis de interpretar, prejudicando a adoção imediata de medidas de controle da doença na propriedade rural (Almeida, 2009; Bidhendi et al., 2011).

O diagnóstico pode também ser realizado através da utilização de técnicas sorológicas. No caso dos ensaios imunoenzimáticos é realizada a detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma* (Azevedo et al., 2006). A baixa sensibilidade de alguns testes serológicos pode explicar a não detecção de anticorpos em alguns animais infectados limitando o uso da sorologia para avaliar o estado de saúde de rebanhos (Bergonier et al., 1997; Amores et al., 2011; Schubert et al., 2011; Gómez-Martín et al., 2012; Agnone et al., 2013).

A PCR permanece sendo o método mais útil, simples e rápido na detecção de micoplasmas específicos. Esta técnica vem sendo apontada como uma forma de reduzir o tempo necessário para o diagnóstico etiológico, quando comparado com a lactocultura, diminuindo o tempo de detecção para cinco horas (Bandeira et al., 2008). Pode ainda fornecer um sistema de alerta precoce e rápido quando realizados em amostras clínicas, permitindo uma investigação completa (Nicholas et al., 2008). Dessa forma, a identificação genômica de micoplasmas em pequenos ruminantes tem sido bastante difundida (Dedieu et al., 1995; LeGrand et al., 2004; Zendulková et al., 2007; Bidhendi et al., 2011).

Os primeiros trabalhos de diagnóstico de *Ma* por PCR foram publicados por González et al. (1995), Tola et al. (1996) e Tola et al. (1997). Estes autores desenvolveram a metodologia de PCR convencional para detecção de *Ma* que é utilizada até os dias atuais.

Vários trabalhos têm sido realizados com o intuito de comparação entre os métodos de PCR convencional e de cultivo. De La Fe et al. (2009) compararam a cultura e a PCR na detecção de *Ma* e *Mycoplasma micoides* cluster em amostras de conduto auditivo obtidas de oito rebanhos Murciano-Granadina na Espanha, com superioridade da PCR por ser um método mais rápido e eficiente. A utilização da PCR também foi eficiente na detecção de *Ma* em 147 amostras de sêmen em um centro de inseminação artificial na Espanha (De La Fe et al., 2010). Bidhendi et al. (2011) compararam o método de cultura e de PCR na detecção de *Ma* em amostras de ovinos e caprinos no Irã, observando uma pequena diferença entre os métodos, sendo a cultura mais sensível. No entanto, os autores recomendam a utilização da PCR por reduzir o tempo de detecção. Estudo realizado com diferentes tipos de amostras (leite, secreção conjuntival, líquido sinovial e secreção do conduto auditivo) colhidas no Irã para avaliar a sensibilidade dos métodos de cultura e PCR no diagnóstico de *Ma* em ovinos, verificou que as amostras de conjuntiva e leite foram mais adequadas para a detecção por PCR (Khezri et al., 2012).

Com o advento da PCR em tempo real (qPCR) é possível não somente atingir resultados rapidamente, mas também quantificar o número de organismos presentes (Nicholas et al., 2008). Com este intuito, Lorusso et al. (2007) desenvolveram uma metodologia de qPCR para detecção de *Ma* no leite de ovinos na Itália. Estes autores compararam a PCR convencional e a qPCR, sendo a última de maior sensibilidade, além das vantagens de menor tempo para processamento, menor risco de contaminação e maior especificidade. Oravcová et al. (2009) também observaram maior sensibilidade da qPCR, particularmente em amostras de leite (individual e de tanque de refrigeração) de ovinos. No entanto, não existe ainda um teste que possa ser amplamente recomendado (Nascimento et al., 2003).

Diante do exposto, é evidenciada a necessidade de incluir esse micro-organismo em estudos com pequenos ruminantes leiteiros no Brasil e a implementação de programas de controle de micoplasmose, uma vez que a doença causada se dissemina rapidamente.

3 RESISTÊNCIA GENÉTICAS ÀS DOENÇAS

A resistência genética a doenças pode ser utilizada como uma ferramenta benéfica para a pecuária. Numa escala global, a resistência poderia ser definida como a capacidade de evitar a doença ou promover a rápida recuperação após uma infecção (Rupp & Boichard, 2003).

O sistema imunológico é um mecanismo específico que atua limitando as infecções, sendo fundamental para a sobrevivência do animal, desde que atue de forma eficaz (Jardim et al., 2014). Com o intuito de prevenir o estabelecimento da doença, através da elaboração de respostas imunológicas, os mecanismos de defesa da glândula mamária são classificadas em imunidade natural ou inespecífica e em imunidade específica ou adaptativa (Fonseca & Santos, 2000; Carneiro et al., 2009). A imunidade natural é predominante no início da infecção, sendo ativada rapidamente por numerosos estímulos e não aumentam de intensidade pela exposição repetida ao mesmo micro-organismo (Fonseca & Santos, 2000; Rainard & Riollet, 2006). Por outro lado, a imunidade específica é ativada quando a infecção progride e não apresenta solução, sendo um processo de aprendizagem do sistema imune, voltado ao combate de um agente patogênico único (Fonseca & Santos, 2000; Jardim et al., 2014). Conjuntamente, a imunidade natural e a específica participam de um processo eficaz de defesa do hospedeiro, garantindo que os animais apresentem resistência às enfermidades (Tizard, 2008).

A imunidade natural é a primeira linha de defesa contra as infecções (Abbas et al., 2008) e, conseqüentemente, apresenta grande influência na susceptibilidade à doença, onde as células epiteliais que cobrem a superfície interna da glândula mamária desempenham papel crucial nas primeiras interações entre patógeno e hospedeiro, contribuindo como barreira definitiva entre o ambiente exterior e o interior do corpo (Korhonen et al., 2000). No entanto, a sobrevivência e a patogenicidade dos micro-organismos causadores de infecção são influenciadas pela capacidade destes microrganismos de resistir aos mecanismos efetores de imunidade (Abbas et al., 2008).

Os genes envolvidos na resposta imune têm sido indicados como fortes candidatos na determinação de resistência às doenças nos animais domésticos (Fonseca et al., 2009). Com o advento da biotecnologia, a maioria dos estudos têm sido voltados para a busca por associação de genes candidatos com características de defesa do hospedeiro. Informações sobre a imunidade da glândula mamária em bovinos têm avançado significativamente (Carneiro et al., 2009), enquanto que trabalhos com esse objetivo em cabras leiteiras ainda são escassos. Desta forma, a investigação dos polimorfismos gênicos associados com a

resposta imunitária e resistência à doença em caprinos vêm ganhando ênfase por permitir a seleção de animais superiores, a sua incorporação nos rebanhos regionais e a obtenção de produtos de melhor qualidade.

A conservação da diversidade genética é hoje universalmente aceita como vital para o desenvolvimento sustentável e gestão dos recursos genéticos animais (Ajmone-Marsan 2010; Salles et al 2011). Doenças economicamente importantes em animais domésticos representam um problema e a busca pela identificação de genes ou regiões cromossômicas associadas a uma maior resistência do hospedeiro aos patógenos vem sendo apontada como uma necessidade para prevenção de doenças.

3.1 Resistência à mastite

A mastite caracteriza-se por ser uma das enfermidades que acarreta grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite, e até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária, sendo considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo (Ribeiro et al., 2007).

As perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade são resultantes da redução da quantidade e qualidade do leite e produtos lácteos, morte precoce dos animais, custos com drogas, serviço veterinário e necessidade de aumento da mão-de-obra (Cunha et al., 2006; Pinheiro et al., 2007). Deve-se levar em consideração ainda os riscos à saúde pública pela comercialização de leite com resíduos de antibióticos, além do impacto social, principalmente no que se refere à criação caprina, uma vez que esta é geralmente desenvolvida em pequenas propriedades e gerida por famílias de agricultores, tendo importante contribuição no desenvolvimento socioeconômico do país (Martin, 2011; Nogueira et al., 2008).

Trata-se de uma doença desafiadora e onerosa para a indústria de laticínios e para os pecuaristas, sendo a seleção de animais mais resistentes e a incorporação desta característica aos rebanhos uma alternativa para redução dos problemas causados pela mastite (Fonseca et al., 2009). No entanto, verifica-se que a seleção tem sido voltada, ao longo do tempo, ao aumento na quantidade de leite, enquanto características relacionadas à resistência a mastite e à composição do leite têm sido pouco consideradas em programas de criação (Nascimento et al., 2006).

A resistência à mastite é uma função complexa e envolve diversos caminhos biológicos, moleculares e celulares, onde numerosos genes candidatos podem estar envolvidos (Rupp & Boichard, 2003). Trata-se de uma resposta imunológica que pode ser desencadeada por mais de um fator etiológico e também com resposta em múltiplos componentes (Ashwell et al., 1997; Pereira et al., 2000).

3.2 Complexo Principal de Histocompatibilidade

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) é uma região do genoma com um denso agrupamento de genes, apresentando fundamental importância no sistema imunológico e exercendo um importante papel na resposta do hospedeiro a patógenos (Magalhães et al., 2004; Kelley et al., 2005).

Essa região tem recebido atenção em relação a sua atuação sobre a resistência à mastite, estando envolvidos nos processos celulares relacionados ao sistema imunológico dos animais, sendo altamente polimórficos nas diferentes espécies e responsáveis por codificar as proteínas presentes na superfície das células e que estão envolvidas na relação entre antígeno e anticorpo (Mota, 2003).

O MHC caracteriza-se como alvo potencial na identificação de genes candidatos nos estudos da variação molecular, devido a sua influência sobre as características produtivas e às relacionadas à saúde animal, uma vez que apresenta ação direta sobre as funções imunológicas, podendo ainda apresentar efeito indireto sobre as características de produção, onde indivíduos que apresentem melhores condições gerais de saúde podem ser mais produtivos (Machado et al., 2005). Segundo estes autores, quando identificado e verificado o efeito de um gene candidato, ele pode ser imediatamente utilizado na seleção assistida por marcadores, com resultados satisfatórios.

A região MHC possui uma estrutura relativamente conservada entre as espécies de mamíferos, estando localizada no cromossomo 20 em ovinos, e no cromossomo 23 em bovinos e caprinos (Amills et al., 1998; De Gotari et al., 1998; Baghizadeh et al., 2009; Ilhan et al., 2016). A porção mais polimórfica desta região designa e diferencia a denominação em cada espécie, sendo o MHC bovino denominado de região BoLA – *Bovine Lymphocyte Antigen* (Mosafer et al., 2011), o de ovino como Ovar (“*Ovar*” representa *Ovis aries*) (Ilhan et al., 2016) e na espécie caprina denominado de região CLA – *Caprine Lymphocyte Antigen* ou GoLA – *Goat Lymphocyte Antigen* (Zhao et al., 2011).

Em mamíferos os produtos dos genes localizados nessa região estão divididos em três classes com base em diferenças nas suas funções: Classe I, Classe II e Classe III. As Classes I e II apresentam maior diversidade polimórfica (Baghizadeh et al., 2009, Zhao et al., 2011; Paracha et al., 2015), sendo que os produtos dos genes da Classe I são encontrados na superfície das células do organismo, enquanto que os da Classe II são expressos em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos (Ahmed & Othman, 2006; Zhao et al., 2011). A Classe III apresenta vários genes com funções gerais, sendo que apenas alguns estão envolvidos na resposta imunológica (Guillemot et al., 1988).

O MHC em caprinos, ovinos e bovinos apresenta-se de forma semelhante, possuindo dois antígenos da Classe II funcionalmente expressos, o DQ e o DR, sendo estes extensamente caracterizados em ovinos e bovinos, enquanto que em cabras apenas quatro genes foram identificados: GoLA-DRA, GoLA-DRB, GoLA-DYA e GoLA-DIB (Amills et al., 2004; Yadav et al., 2016).

DRB é o gene da Classe II mais polimórfico, sendo os alelos dos genes BoLA-DRB em bovinos amplamente estudados e associados com a ocorrência de doenças e características de produção (Sharif et al., 1998; Trujillo-Bravo et al., 2005; Nascimento et al., 2006; Vilaça et al., 2016). No entanto, ao contrário dos avanços observados nos estudos com vacas leiteiras, pouca informação ainda existe acerca da região MHC e de suas possíveis associações ovinos e caprinos (Charon, 2004; Petlane et al., 2012).

3.2.1 Gene GoLA (*Goat Lymphocyte Antigen*)

Em cabras leiteiras os genes DR da Classe II foram os mais bem caracterizados e o segundo éxon do gene DRB (GoLA-DRB.2) é a região mais estudada devido ao seu elevado polimorfismo, além de ser considerado responsável pelas diferenças na resposta imunológica dos indivíduos aos agentes infecciosos (Baghizadeh et al., 2009; Paracha et al., 2015).

A pesquisa sobre a genética da resistência às doenças em cabras ainda é escasso e pouco se sabe sobre a frequência alélica desse gene e as possíveis associações entre os seus alelos (Petlane et al., 2012; Shrivastava et al., 2015). Além disso, esse gene tem sido relacionado com uma ampla variedade de características de produção e para seleção de características de segurança e qualidade do produto em animais domésticos (Paracha et al., 2015).

A Tabela 1 apresenta a evolução das pesquisas realizadas no mundo voltadas ao estudo do gene GoLA em cabras leiteiras.

Tabela 1. Evolução dos estudos voltados à identificação de polimorfismos do gene GoLA em caprinos.

REFERÊNCIA	ESPÉCIE	PAÍS	OBJETIVO
Amills et al. (1996)	Caprino	Espanha	Descrição da técnica NESTED-PCR associada ao RFLP para amplificação do segundo éxon da Classe II do MHC caprino em cabras e em outras espécies
Dongxiao & Yuan (2004)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Ahmed & Othman (2006)	Caprino	Egito	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Li et al. (2006)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB3.2 por PCR-RFLP
Baghizadeh et al. (2009)	Caprino	Irã	Identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB3 por PCR-RFLP
Zhao et al. (2011)	Caprino	China	Identificação de polimorfismos do gene CLA-DRB3 por PCR-RFLP
Singh et al. (2012)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Petlane et al. (2012)	Caprino	Indonésia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB por PCR-RFLP
Yakubu et al. (2013)	Caprino	Nigéria	Diversidade filogenética do gene MHC-DBQ1
Shrivastava et al. (2015)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene MHC-DRB1 por PCR-RFLP e sequenciamento
Yadav et al. (2016)	Caprino	Índia	Identificação de polimorfismos do gene CLA-DRB3 por PCR-RFLP e associação com resistência aos nematoides gastrointestinais

Um dos primeiros estudos sobre o éxon 2 da região GoLA-DRB em caprinos foi realizado por Amills et al. (1995), que desenvolveram uma NESTED-PCR para amplificação desse gene. Os mesmos autores no ano seguinte publicaram um novo artigo mais completo (Amills et al., 1996) com um acréscimo de um novo passo após amplificação, onde foi realizada a digestão do produto amplificado com enzimas de restrição (PCR-RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), sendo esta a metodologia mais amplamente utilizada nos estudos sobre a identificação de polimorfismos do gene GoLA-DRB.2.

A figura 1 apresenta a eletroforese do gene GoLA-DRB3, utilizada por Yadav et al. (2016) para amplificação do fragmento de 285 pb e após digestão com a enzima de restrição *PstI*.

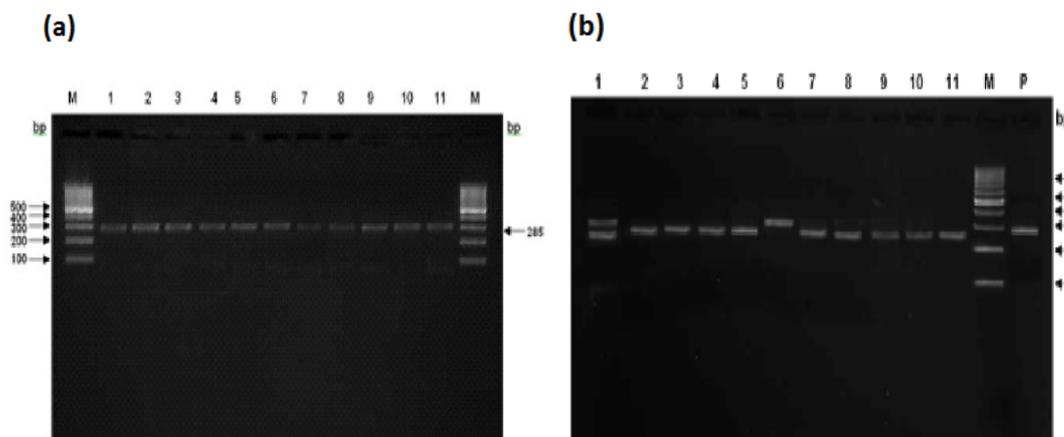


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2%. (a) Produtos de PCR do gene GoLA-DRB3 (285 pb); (b) Mesmas amostras após digestão com a enzima de restrição *PstI*.

Fonte: Yadav et al. (2016).

O estudo mundial sobre o polimorfismo genético do gene GoLA-DRB.2 em caprinos tem sido focado na identificação das frequências alélicas e genotípicas através da utilização de enzimas de restrição (Amills et al., 1996; Dongxiao & Yuan, 2004; Baghizadeh et al., 2009; Zhao et al., 2011; Singh et al., 2012; Petlane et al., 2012; Yadav et al. 2016). Muito ainda está para ser conhecido sobre a interpretação biológica e relevância fenotípica de características relacionadas à resistência à mastite. Estudos adicionais ainda são necessários para a confirmação das associações dos alelos do GoLA-DRB.2 aos fenótipos e a resistência de doenças como a mastite, visando utilizar os resultados para a melhoria genética através da resistência a doenças na pecuária.

Apesar do aumento verificado nos últimos anos sobre as informações de caracterização genética em caprinos, não existem dados relacionados ao gene citado sobre os polimorfismos genéticos nem sua associação com características de interesse econômico em rebanhos caprinos nacionais.

O estudo do polimorfismo genético do gene GoLA-DRB.2 e a identificação de variações alélicas específicas podem contribuir no desenvolvimento de marcadores genéticos para identificação e incorporação nos rebanhos de animais mais resistentes a doenças, com características de segurança e qualidade do produto, além de auxiliar no

desenvolvimento de estratégias de criação de cabras leiteiras (Paracha et al., 2015; Shrivastava et al., 2015).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

AGNONE, A.; MANNA, M.L.; SIRECI, G.; PULEIO, R.; USTICANO, A.; OZDEMI, U.; NICHOLAS, R.A.J.; CHIARACANE, V.; DIELIA, F.; MARCO, V.D.; LORIA, G.R. A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 112, p. 230-234, 2013.

AJMONE-MARSAN, P. The Globaldiv Consortium: a global view of livestock biodiversity and conservation. **Animal Genetics**, v. 41, p. 1-5, 2010.

AHMED, S.; OTHMAN, O.E. APCR-RFLP method for the analysis of Egyptian goat MHC Classe II DRB Gene. **Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 58-61, 2006.

AKWUOBU, C.A.; AYLING, R.D.; CHAH, K.F.; OBOEGBULEM, S.I. Studies into the prevalence of *Mycoplasma* species in small ruminants in Benue State, North-central Nigeria. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 1087-1092, 2014.

ALBUQUERQUE, I.R.R. **Perfil sanitário de rebanhos caprinos da região de Senhor do Bonfim, Estado da Bahia - Brasil**. 2008. 46p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande – PB.

ALCÂNTARA, M.D.B.; CAMPOS, A.C.; MELO, M.A.; PEREIRA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, E.R.; FARIAS, A.A. SOUSA, D.R.M.; AZEVEDO, E.O. Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p. 561-564, 2013.

ALMEIDA, J.F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura**. 2009. 109p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense – RJ.

ALMEIDA, J.F.; AQUINO, M.H.C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M.L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.13-18, 2013.

AL-MOMANI, W.; ABO-SHEHADA, M.N.; RAJ, N. Seroprevalence of and risk factors for *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* infection in small ruminants in northern Jordan. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 463-9, 2011.

ALVES, B.H.L.S., SILVA, J.G., MOTA, A.R., CAMPOS, A.C., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., SANTOS, S.B., MOTA, R.A. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1309-1312, 2013.

AMILLS, M.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A. Nested PCR allows the characterization of *TaqI* and *PstI* RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 313-321, 1995.

AMILLS, M.; SULAS, C.; SANCHEZ, A.; BERTONI, G.; ZANONI, R.; OBEXER-RUFF, G. Structural characterization of the caprine major histocompatibility complex class II DQB1 (CahI-DQB1) gene. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 843-846, 2004.

AMILLS, M.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A.A PCR-RFLP typing method for the caprine MHC classe II DRB gene. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 255-260, 1996.

AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; LEWIN, H.A. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.

AMORES, J.; DE LA FE, C.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J.C.; CONTERAS, A.; SÁNCHEZ, A. Preserved goat milk as a valid sample for the PCR detection of *Mycoplasma agalactiae*. **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 61-64, 2011.

AMORES, J.; SÁNCHEZ, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J.C.; CONTERAS, A.; DE LA FE, C. Surveillance of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in dairy goat herds. **Small Ruminant Research**, v. 102, p. 89-93, 2012.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 1-6, 2012.

ASHWELL, M. S.; REXROAD Jr., C. E.; MILLER, R. H.; Van RADEN, P. M.; DA, Y. Detection of loci affecting Milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 28, p. 216-222, 1997.

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 Agalactia* in Small Ruminants in Brazil: first report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 576-581, 2006.

BAGHIZADEH, A.; BAHAAADDINI, M.; MOHAMADABADI, M.R.; ASKARI, N. Allelic variations in exon 2 of Caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.6, n. 4, p. 454-459, 2009.

BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; NASCIMENTO, E.R.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1255-1258, 2008.

BARBOSA, V.P.; NASCIMENTO, E.R.; DANELLI, M.G.M.; NASCIMENTO, M.G.F.; SANTOS, M.A.J.; LIGNON, G.B.; RIBEIRO, V.R. Diferenciação de tipos de *Mycoplasma mycoides* na etiopatogenia da micoplasmose caprina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 33-36, 2000.

BERGONIER D, BERTHELOT X, POUMARAT F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Revue scientifique technique**, OIE, v.16, p. 848-73, 1997.

BIDHENDI, M.; KHAKI, S.; PILEHCHIAN, R.L. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and Polymerase Chain Reaction in sheep and goat milk samples in Kordestan province, Iran. **Archives of Razi Institute**, v.66, n.1, p.11-16, 2011.

BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F. **O efeito da mastite no leite**. IN: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. A qualidade do leite. Juiz de Fora: EMBRAPA/SÃO PAULO: TORTUGA, 1998. p.83-90.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n.6, p. 1934-1943, 2009.

CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Agalaxia contagiosa. Um “novo” problema para caprinos e ovino do Brasil. **Ciência veterinária nos trópicos**, v.18, n. 2, p. 34-38, 2015.

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

CARDOSO, HFT.; CARMO, LS.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p.7-10, 2000.

CASTRO-ALONSO, A.; DE LA FE, C.; MONTEROS, A.E.; RODRÍGUEZ, F.; ANDRADA, M.; POVEDA, J.B.; HERRÁEZ, P. Chronological and immunohistochemical characterization of the mammary immunoinflammatory response in experimental caprine contagious agalactia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 43–54, 2010.

CHARON, K. Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. **Animal Sciences papers and reports**, v. 22, n. 1, p. 135-139, 2004.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v.79, p.273-283, 2003.

CONTRERAS, A.; MIRANDA, R.E.; SÁNCHEZ, A.; DE LA FE, C.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C. Presence of *Mycoplasma* species and somatic cell counts in bulk-tank goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 75, p. 247–251, 2008.

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. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3165-3171, 2004.

CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; MARCO, J.C. Sensibilidade antibiótica *in vitro* de *estafilococos* y corine bacterias aisladas de mamitis subclínicas caprinas. **Medicina Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 16-24, 1995.

CORREA, C.M.; MICHAELSEN, R.; RIBEIRO, M.E.R.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; SCHMIDT, V. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 3, p. 273-278, 2010.

CUNHA, A. P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo Instituto de Biologia, São Paulo**, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

DAL POZZO, M.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROS-SATO, L.; SOARES, I.S.; ALVES, S.H.; COSTA, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência rural**, v.41, p.667-672, 2011.

DAMASSA A.J., WAKENELL P.S.; BROOKS D.L. *Mycoplasmas* of goats and sheep: review article. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 4, p.101-113, 1992.

DE GOTARI, M.J.; FREKING, B.A.; CUTHBERTSON, R.P.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; LEVYMASTER, K.A.; DODDS, K.G.; CRAWFORD, A.M.; BEATTIE, C.W. A second generation linkage map of the sheep genome. **Mammalian genome**, v. 9, p. 204-209, 1998.

DE LA FE, C.; AMORES, J.; MARTIN, A.G.; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C. *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. **Theriogenology**, v.72, p. 1278-1281, 2009.

DE LA FE, C.; MARTÍN, A.G.; AMORES, J.; CORRALES, J.C.; SÁNCHEZ, A.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Latent infection of male goats with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma*

- mycoides* subspecies *capri* at an artificial insemination centre. **The Veterinary Journal**, v. 186, p. 113–115, 2010.
- DEDIEU, L.; MADY, V.; LEFREVE, P. Development of two PCR assays for the identification of micoplasmas causing contagious agalactiae. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, p. 243-250, 1995.
- DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.
- Dongxiao, S. & Yuan, Z. Polymorphisms of the Second Exon of MHC-DRB Gene in Chinese Local Sheep and Goat. **Biochemical Genetics**, v. 42, p. 385-390, 2004.
- FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X; PETERHANS, E.; FREY, J.; VILEI, E.M. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5612–5621, 2002.
- FONSECA, I.; SILVA, P.V.; LANGE, C.C.; GUIMARÃES, M.F.M.; WELLER, M.M.; DEL CAMBRE, A.; SOUSA, K.R.S.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, J.D. AND GUIMARÃES, S.E.F. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 776-781, 2009.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 17- 26, 2000.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.
- GÓMEZ-MARTÍN, A.; UC, N.; VIEIRA, L.A; GADEA, J.; CADENS, J.; SÁNCHEZ, A.; DE LA FE, C. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. **Theriogenology**, v. 83, p. 911–919, 2015.
- GÓMEZ-MARTÍN, A.; DE LA FE, C.; AMORES, J.; SÁNCHEZ, A.; CONTERAS, A.; PATERNA, A.; BUENDÍA, J.; CORRALES, J.C. Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers. **Veterinary Microbiology**, v. 157, p. 355–362, 2012.
- GONZÁLEZ, Y.R.C.; BASCUÑANA, C.R.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J.G.; MOLINA, C.F.; JOHANSSON, K.E. In vitro amplification of the 16s rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 183-190, 1995.
- GUILLEMOT, F.; FRÉCHIN, N; BILLAULT, A.; CHAUSSÉA.M.; ZOORO, R.; AUFRAY, C. Isolation of chicken Major Histocompatibility Complex class II (B-L) beta chain sequences: comparison with mammalian beta chains and expression in lymphoid organs. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 4, p. 103-109, 1998.
- ILHAN, F.; KESKIN, I.; TOZLUCA, A. Identification of genetic variation in the major histocompatibility complex gene region in Turkish sheep breeds. **South African Society for Animal Science**, v. 46, n.4, 2016.
- JARDIM, J.G.; QUIRINO, C.R.; PACHECO, A.; LIMA, G.R.S. Melhoramento genético visando à resistência a mastite em bovinos leiteiros. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, p. 199-219, 2014.
- JAUBERT, G. Biochemical characteristics and quality of goat milk. **CIHEAM – IAMZ**, v.25, p.71-74, 1997.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. **Immunogenetics**, v. 56, p. 683-695, 2005.

KHEIRKHAH, B.; POURBAKHS, S.A.; ASHTARI, A.; BAYATZADEH, M.A.; AMINI, K.; ABTIN, A. The molecular characterization of *Mycoplasma agalactiae* isolates from Iranian goats when compared with other Iranian isolates and vaccinal strains. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 4, p. 324-329, 2013.

KHEZRI, M.; POURBAKHS, S.A.; ASHTARI, A.; ROKHZAD, B.; KHANBABAIE, H. Isolation and prevalence of *Mycoplasma agalactiae* in Kurdish sheep in Kurdistan, Iran. **Veterinary World**, v. 5, n.12, 2012.

KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H.S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 75-80, 2000.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A.K.; DHAMAS, K. *Mycoplasma agalactiae* an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

KUMAR, V.; RANA, R.; MEHRA, S.; ROUT, P.K. Isolation and Characterization of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* from Milk of Natural Goat Mastitis Cases. **ISRN Veterinary Science**, v. 2013, 2013.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LEGRAND, D.; SARA, E., BLOND, D.; SOLSONA, M.; POUMARAT, F. Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. **Veterinary Research**, v. 35, p. 635-649, 2004.

LI, M.H.; LI, K.; KANTANEN, J.; FENG, Z.; FAN, B.; ZHAO, S.H. Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Chinese indigenous goats. **Small Ruminant Research**, v. 66, p. 236-243, 2006.

LORUSSO, A.; DECARO, N.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; FASANELLA, A.; BUONAVOGLIA, D. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 918-923, 2007.

MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; CAMPOS, A.L.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.F. Associação do loco BoLA-DRB3.2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, v. 3, p. 380-389, 2005.

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

MAGALHÃES, P.S.C.; BÖHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. **Revista Medicina UCPEL**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2004.

MANSO-SILVÁN, L.; VILEI, E.M.; SACHSE, K.; DJORDJEVIC, S.P.; THIAUCOURT, F.; FREY, J. *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1353-1358, 2009.

MARINHO, M.L. **Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos.** 2008. 113p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – PE.

MARQUES, LM. **Estudo da variabilidade genética e dos fatores de virulência de isolados de *Ureaplasma diversum*.** 2009. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - SP.

MARTIN, J.G.P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MELO, A.L. **Efeito de polimorfismo nos loci CSN1S1, GH, DGAT1 e POU1F1 sobre os valores genéticos de produção e composição do leite de cabra.** 2012. 90p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa - MG.

MOSAFER, J.; HEYDARPOUR, M.; MANSHAD, E.; RUSSELL, G.; SULIMOVA, G.E. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-6, 2011.

MOTA, A.F. **Descobrimos genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina.** (Tese de doutorado). 170p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 57-61, 2008.

NASCIMENTO, C.S.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.B.; GUIMARÃES, M.F.M.; CAMPOS, A.L.; AZEVEDO, A.L.S.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; OLIVEIRA, D.A.A. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 641-647, 2006.

NASCIMENTO, E. R. Micoplasmose caprina e ovina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE O AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2.; ESPAÇO APRISCO NORDESTE, 1., 2003, João Pessoa. **Anais...=Proceedings...** João Pessoa: EMEPA, 2003, p. 141-151.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREUNDT, E.A.; ANDERSEN, H. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from Outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **British Veterinary Journal**, v. 1, n. 142, p. 246-257, 1986.

NICHOLAS, R.; AYLING, R.; McAULIFFE, L. **Mycoplasma diseases of ruminants.** CABI, Wallingford, UK; 239 p., 2008.

NICOLETTI, P. **Goat disease and human health.** In: International Conferences on Goats, 1987, Brasília. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, 1987. v.1, p.491 – 511.

NOGUEIRA, D.M.; CHAPAVAL, L.; NEVES, A.L.A.; COSTA, M.M. **Passos para obtenção do leite de cabra com qualidade.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 6p. (Comunicado Técnico, 135).

OLIVEIRA, A.A.F.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; CHAPAVAL, L.; PINHEIRO, A.A. **Micoplasmose em pequenos ruminantes.** Sobral – CE: Embrapa Caprinos, 2004.

ORAVCOVÁ, K.; LOPEZ-ENRIQUEZ, L.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; HERNANDEZ, M. *Mycoplasma agalactiae* p40 gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by

real-time pcr: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 445–450, 2009.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE), Contagious Caprine Pleuropneumonia. In **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines**, 5 ed. 1000-12, 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>.

PARACHA, H.; HUSSAIN, T.; TAHIR, M.Z.; YASMEEN, A.; PERVEZ, M.T.; SHEIKH, A.A.; HAIDER, A.; ALI, R.; KHAN, W.A. Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene, as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review. **Journal of Infection and Molecular Biology**, v. 3, p. 19-23, 2015.

PEIXOTO, R.M.; PEIXOTO, R.M.; LIDANI, K.C.F.; COSTA, M.M. Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p. 322-325, 2013.

PENHA, A.M.; D'APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 13, p. 299-301, 1942.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÉS, G. A. Mecanismos de defesa da glândula mamária de bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 3, n. 3, p. 176-190, 2000.

PETLANE, M.; NOOR, R.R.; MAHESWARI, R.R.A. The Genetic Diversity of TLR4 MHC-DRB Genes in Dairy Goats Using PCR-RFLP Technique. **Media Peternakan**, v. 35, n. 2, p. 91-95, 2012.

PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A. Enfermidades Infeciosas de Pequenos Ruminantes: Epidemiologia, Impactos Econômicos, Prevenção e Controle: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.1, p. 44 – 66, 2007.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 499 p., 2007.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v.37, n.3, p.369- 400, 2006.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.4, p.1094-1156, 1998.

RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D. et al. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 810-812, 2007.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: Criação racional de caprinos**. São Paulo. Nobel, 1997. 318 p

ROTTEM, S. Interactions of mycoplasmas with host cells. **Physiology Review**, v. 83, p. 417-432. 2003.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 671-688, 2003.

SALLES, P.A.; SANTOS, S.C.; RONDINA, D.; WELLER, M. Genetic variability of six indigenous goat breeds using major histocompatibility complex-associated microsatellite markers. **Journal Veterinary Science**, v. 12, p. 127-132, 2011.

SANTOS, L.M.M; PEREIRA, C.S.; MACHADO, L.S.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, E.R.. Queda na produção de leite de cabras por suto de micoplasmose. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

SANTOS, O.M.; CAMPOS, A.C.; SANTOS, J.P.; SANTOS, O.M.; CALDAS, E.L.C.; SANTOS, A.D.F.; NASCIMENTO, E.R.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado de Sergipe: dados preliminares. **Scientia Plena**, v. 11, n. 4, 2015.

SANTOS, S.B. **Imunoperoxidase e métodos moleculares na detecção de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) em conduto auditivo de bovinos e em *Railletia* spp. (Gamasida: Railletidae)**. Seropédica, 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SCHASCHL, H.; GOODMAN, S.J.; SUCHENTRUNK, F. Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 265–277, 2004.

SCHUBERT, E.; SACHSE, K.; JORES, J.; HELLER, M. Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. **BMC Veterinary Research**, v. 7, p. 72, 2011.

SHAHRAM, M.; NICHOLAS, R.A.J.; WOOD, A.P.; KELLY, D.P. Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 20 – 24, 2010.

SHARIF, S.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; DEKKERS, J. C. M.; LESLIE, K. E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.185-193, 1998.

SHRIVASTAVA, K.; KUMAR, P.; SAHOO, N.R.; KUMAR, A.; KHAN, M.F.; KUMAR, A.; PRASAD, A.; PATEL, B.H.M.; NASIR, A.; BHUSHAN, B.; SHARMA, D. Genotyping of major histocompatibility complex Class II DRB gene in Rohilkhandi goats by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing. **Veterinary World**, v. 8, n. 10, p. 1183-1188, 2015.

SILVA, N.S.; AZEVEDO, E.O.; CAMPOS, A.C.; CORDEIRO, A.A.; MAMEDE, A.G.; SILVA, R.B.S.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, E.R.; MARINHO, M.L. Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 631-634, 2014.

SILVA, N.S.; MARINHO, M.L.; AZEVEDO, E.O.; CAMPOS, A.C.; CARVALHO, M.G.X. Tratamento alopático e homeopático em caprinos com agalaxia contagiosa: estudo comparativo. **Archives of Veterinary Science**, v.18, n.4, p.57-64, 2013.

SINGH, P.K.; SINGH, M.K.; SAXENA, V.K.; SINGH, A.V.; SOHAL, J.S. Genetic analysis of MHC Class II DRB gene in an endangered Jamunapari breed os goat. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 220-223, 2012.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, M.; JACOB, D.; BARRÉ, A.; BARBE, V.; SCHENOWITZ, C.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; SEGURENS, B.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; CITTI, C. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. **PLoS Genetics**, v. 3, p. 74–89, 2007.

SZEREDI, L.; TENK, M.; DAN, A. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. **Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 50, p. 172-177, 2003.

THIAUCOURT, F.; BÖLSKE G. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. **Revue Scientifique et Technique**, v. 15, p. 1397–1414, 1996.

TIZARD, I.R. 2008. **Veterinary Immunology an Introduction**, Eighth Ed. Saunders, New York.

TOLA, S., ANGIOI, PP., ROCCHIGIANI, AM., IDINI, G., MANUNTA, D., GALLERI, G., LEORI, G. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 17-22, 1997.

TOLA, S.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; ANGIOI, A.; ROCCHIGIANI, A.M.; LEORI, G. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 143, n. 2-3, p. 259–265, 1996.

TRUJILLO-BRAVO, E.; RODRÍGUEZ-Y, P.A.; CERON-MUÑOZ, M. Caracterización y análisis de asociación de BoLA-DRB3 con El conteo de células somáticas, em La raza Holstein en Antioquia, Colombia. **Actual Biol**, v. 27, n.83, p.171-178, 2005.

TULLY, J.G.; BOVÉ, J.M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R.F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmatales* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*, and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 378- 385, 1993.

VARELA, F.A.P.R. **Tipificação de *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC e detecção da sua aderência a células epiteliais pulmonares.** (Dissertação de mestrado em Genética Molecular e Biomedicina). 74p. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2010.

VILAÇA, L.F.; DINIZ, W.J.S.; MELO, T.F.; OLIVEIRA, J.C.V.; GUIDO, S.I.; BRITO, C.E.V.L.; COSTA, N.A.; SANTORO, K.R. Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no estado de Pernambuco. **Revista Archivos de Zootecnia**, v. 65, p. 249, p. 7-11. 2016.

WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.155-162.

WANG, H.; NI, L.; YANG, H.; XU, L.; MA, N.; DING, H. Isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* cluster strains from goats in Chongqing, China. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, p. 11-15, 2014.

YADAV, A.K.; TOMAR, S.S.; KUMAR, A.; THAKUR, M.S. Association of caprine lymphocyte antigen-DRB3 gene with gastrointestinal nematode resistance in Sirohi and Barbari breeds of goat. **Indian Journal of Animal Research**, v. 50, n. 6, p. 958-963, 2016.

YAKUBU, A.; SALAKO, A.E.; DONATO, M.; TAKEET, M.I.; PETERS, S.O.; ADEFENWA, M.A.; OKPEKU, M.; WHETO, M.; AGAVIEZOR, B.O.; SANNI, T.M.; AJAYI, O.O.; ONASANYA, G.O.; EKUNDAYO, O.J.; ILORI, B.M.; AMUSAN, S.A.; IMUMORIN, I.G. Genetic diversity in Exon 2 of the Major Histocompatibility Complex Class II DBQ1 Locus in Nigerian Goat. **Biochemical Genetics**, v. 51, p. 954-966, 2013.

ZENDULKOVÁ, D.; MADANAT, A.; LANY, P.; ROSENBERGOVA, K.; POSPISIL, Z. Detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction in Jordanian sheep and goat herds. **Acta Veterinaria Brno**, v. 76, p. 71-77, 2007.

ZHAO, Y.; XU, H.; SHI, L.; ZHANG, J. Polymorphisms in Exon 2 of MHC Class II DRB3 Gene of 10 Domestic Goats in Southwest China. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 6, p. 752-756, 2011.

CAPÍTULO II

Detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil

1 **Detecção de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em rebanhos**
2 **caprinos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil**

3
4
5 Resumo: As micoplasmoses são enfermidades infecciosas de distribuição mundial e uma das
6 doenças mais graves de pequenos ruminantes, ocasionando sérias perdas ao produtor. A rápida
7 detecção das espécies de *Mycoplasma* é fator determinante para adoção de medidas de controle
8 da doença na propriedade rural. Portanto, este estudo teve por objetivo a detecção de
9 *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) e *Mycoplasma mycoides* cluster (*Mm_{cluster}*), bem como avaliar a
10 composição e a contagem de células somáticas em amostras de leite provenientes de animais
11 positivos. Para isto, foram colhidas 373 amostras de leite de caprinos de diferentes raças
12 pertencentes a rebanhos localizados nos estados de Pernambuco e da Paraíba. O DNA genômico
13 das amostras de leite foi extraído pelo método sílica/isotiocianato de guanidina, seguida da
14 amplificação genérica e espécie-específica por PCR. A identificação da presença ou não de
15 produtos gênicos foi realizada através de observação direta das bandas dos produtos de PCR
16 visualizados em gel de eletroforese. Análises de variância e testes de comparação de médias
17 foram realizados para verificar os efeitos da positividade sobre as características de composição
18 e contagem de células somáticas. As frequências para *Ma* e *Mm_{cluster}* foram de 43,21% e 5,70%,
19 nos rebanhos avaliados, respectivamente. Foram considerados fatores de risco o sistema de
20 criação ($p < 0,001$) e o padrão racial ($p < 0,001$). Em todos os grupos genéticos foram detectadas
21 amostras positivas para *Ma*, sendo observada maior ocorrência na raça Marota. Amostras
22 positivas para *Mm_{cluster}* só foram observadas em animais das raças Moxotó (18,28%), Parda
23 Sertaneja (1,92%) e SPRD (3,12%). No estudo de associação entre a positividade e composição
24 do leite, observou-se diferença estatística para as médias de proteína, caseína e contagem de
25 células somáticas. A detecção de *Mycoplasma* em amostras de leite caprino sugere a introdução
26 de animais infectados nos rebanhos avaliados, como também o possível contato com os agentes

27 etiológicos em feiras e exposições. Além disso, o sistema de criação adotado na propriedade
28 influencia a disseminação da infecção no rebanho.

29

30 Palavras chave: Agalactia contagiosa; Caprinos leiteiros; Micoplasmose; *Mycoplasma*
31 *agalactiae*; *Mycoplasma mycoides* cluster.

32

33

34 **1. Introdução**

35

36 A agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) é uma síndrome multi-etiológica e
37 considerada uma das doenças mais graves de pequenos ruminantes (Kumar et al., 2014).
38 Incluída na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde
39 Animal (OIE) é apontada como responsável por elevadas perdas econômicas (Santos et al.,
40 2015), sendo caracterizada pelo aparecimento de lesões inflamatórias localizadas na glândula
41 mamária, nas articulações e nos olhos dos animais afetados, determinando a tríade clássica da
42 doença (Alcântara et al., 2013; Todaro et al., 2015). No Brasil o Ministério da Agricultura,
43 Pecuária e Abastecimento (MAPA) normatizou o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e
44 Ovinos, no entanto, não foi considerada a vigilância epidemiológica para as micoplasmoses
45 (Souza, 2013).

46 A ACOC é causada por micro-organismos do gênero *Mycoplasma*, pertencentes à classe
47 *Mollicutes* (Razin et al. 1998). Os micoplasmas são organismos procarióticos de vida livre,
48 auto-replicantes, se distinguem de outras bactérias por seu tamanho diminuto (0,3 a 0,8 μm) e
49 pela ausência total de parede celular rígida (Santos et al., 2012; Santos et al., 2015).

50 Em caprinos a enfermidade é causada por mais de uma espécie de micoplasma, sendo o
51 principal agente etiológico *Mycoplasma agalactiae*, responsável por 90% de todos os surtos
52 nesses animais (Alves et al., 2013; Kumar et al., 2014). Espécies pertencentes ao grupo
53 *Mycoplasma mycoides*, também têm relevância como agentes etiológicos da síndrome em
54 caprinos (OIE, 2006). Este grupo consiste em cinco espécies e subespécies de micoplasmas que

55 compartilham muitas características genóticas e fenotípicas (Wang et al., 2014), destacando-se
56 *Mycoplasma mycoides capri* e *Mycoplasma capricolum* subesp. *capricolum* (Szeredi et al.,
57 2003; Santos et al., 2015).

58 Na região Nordeste tem sido relatada ocorrência de *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos
59 localizados nos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Azevedo et al., 2006;
60 Bandeira et al., 2008; Alves et al., 2013). No entanto, nenhum trabalho investigou a presença
61 de espécies do grupo *Mycoplasma mycoides* nessa região.

62 Em função das perdas econômicas que a ACOC pode causar à produção pecuária no
63 Nordeste do Brasil, região que detém aproximadamente 90% dos caprinos do país (Silva et al.,
64 2013), o diagnóstico e a identificação das espécies que causam essa doença podem trazer
65 informações importantes sobre a presença e a circulação desses patógenos nos rebanhos
66 caprinos, diminuindo os impactos causados por essa enfermidade sobre a produção e a
67 qualidade do leite, além de evitar problemas econômicos e de saúde pública (Contreras et al.,
68 2008).

69 Destaca-se que a presença de micoplasmas na glândula mamária representa risco à saúde
70 humana (Nicholas et al., 2008) e determina alterações na composição do leite, tais como, a
71 degradação da gordura, proteínas e carboidratos, o que torna o produto impróprio para o
72 consumo (Cordeiro et al., 2002). Além disso, o aumento da contagem de células somáticas
73 (CCS) do leite também é uma característica que acompanha as micoplasmoses (Corrales et al.,
74 2004; Contreras et al., 2008).

75 Portanto, o presente estudo objetivou a detecção de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) e
76 *Mycoplasma mycoides* cluster (*Mm_{cluster}*), bem como avaliar a composição e a CCS em amostras
77 de leite de cabras positivas, pertencentes a propriedades localizadas nos estados de Pernambuco
78 e Paraíba, Nordeste do Brasil.

79

80

81

82 **2. Material e métodos**

83

84 **Animais e colheita das amostras**

85

86 Foi selecionado um total de 360 matrizes caprinas pertencentes a rebanhos localizados
 87 nos estados de Pernambuco e Paraíba (Tabela 1). O período de colheita ocorreu de julho de
 88 2014 a julho de 2015.

89

90 **Tabela 1.** Número de animais (N) por padrão racial e origem das populações estudadas.

Padrão Racial	N	Origem	Rebanho
Anglo nubiana	13	Pernambuco	C
Marota	31	Paraíba	F
Moxotó	93	Pernambuco/Paraíba	D, E
Murciana	63	Paraíba	F, H
Parda Sertaneja	52	Paraíba	G
Saanen	12	Pernambuco	C
SPRD	96	Pernambuco	A, B

91

92

93 Os sistemas de criação adotado nos rebanhos avaliados eram do tipo intensivo (rebanhos
 94 A, B e C), semi-intensivo (rebanhos E, F, G e H) e extensivo (rebanho D).

95 A colheita das amostras de leite foi realizada após antissepsia dos tetos dos animais com
 96 álcool 70%, seguida pelo descarte dos primeiros jatos de leite. As amostras individuais de leite
 97 foram armazenadas em recipientes de polipropileno estéreis, devidamente identificadas e
 98 armazenadas em caixas isotérmicas. As amostras foram então encaminhadas ao Laboratório de
 99 Qualidade do Leite, do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste
 100 (PROGENE), localizado no Departamento de Zootecnia - UFRPE, para análises físico-químicas
 101 e ao Laboratório de Biologia Molecular da Central de Laboratórios da Unidade Acadêmica de
 102 Garanhuns (UFRPE/UAG), para as análises moleculares.

103

104 **Extração de DNA**

105

106 A extração de DNA foi realizada pelo método de sílica/isotiocianato de guanidina,
107 segundo metodologia descrita por Boom et al. (1990). A qualidade do DNA extraído foi
108 avaliada em gel de agarose a 1%.

109

110 **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

111

112 O material extraído foi submetido à PCR genérica e à espécie-específica com a utilização
113 de diferentes pares de *primers* e ciclos. Inicialmente, foi realizada uma Multiplex-PCR para a
114 amplificação do gênero *Mycoplasma* e do marcador interno selecionado (GAPDH- gliceraldeído
115 3-fosfato desidrogenase), com objetivo de avaliar a presença de possíveis inibidores da PCR e a
116 integridade das amostras de DNA. Para isso, utilizou-se as metodologias descritas por
117 Kuppeveld et al. (1992) e Ravazzolo et al. (2006), para amplificação do gênero (270 pb) e
118 marcador interno (125 pb), respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a
119 amplificação do gênero *Mycoplasma* foram GPO-3 (5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG
120 ATA CCC T - 3') e MGSO (5' - TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC - 3'); e para
121 o marcador interno GAPDH-F (5'- GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT - 3') e GAPDH-R (5'-
122 GTC CCT CCA CGA TGC CAA AG - 3'). As reações foram realizadas em volume final de
123 58µL, sendo 5µL de DNA, 45µL do mix de PCR (Invitrogen, USA) e 2µL de cada um dos
124 quatro *primers* descritos acima. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler®
125 Pro (Eppendorf, Germany), como se segue: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguida de 30
126 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, permanecendo em uma etapa de extensão
127 final de 7 min a 72°C. Foi incluído em todos os testes controle positivo (*Mycoplasma* spp.) e
128 controle negativo (reação sem a presença de DNA).

129 Para PCR espécie-específica, os *primers* utilizados para amplificação de *Ma* foram MA1
130 (5' - AAA GGT GCT TGA GAA ATG GC - 3') e MA2 (5' - GTT GCA GAA GAA AGT CCA
131 ATC A - 3'), com *amplicon* de 375 pb, e para *Mm_{cluster}* F-MC323 (5' - TAG AGG TAC TTT

132 AGA TAC TCA AGG - 3') e R-MC358 (5' - GAT ATC TAA AGG TGA TGG T- 3') para
133 amplificação de segmento gênico de 1500 pb, seguindo metodologia descrita por Tola et al.
134 (1997) e Bashiruddin et al. (1994), respectivamente. As reações de PCR espécie-específica
135 foram realizadas como descrito para o gênero. A amplificação foi realizada em termociclador
136 *Mastercycler® Pro* (Eppendorf, Germany), como se segue: desnaturação inicial por 5 min a
137 94°C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 47,6°C para *Ma* ou 50°C para *Mm_{cluster}* e 1
138 min a 72°C, permanecendo em extensão final de 7 min a 72°C. Foi incluído controle positivo
139 (*Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster) e negativo em todos os testes (reação
140 sem a presença de DNA). Os produtos amplificados foram avaliados através de eletroforese em
141 gel de agarose a 1%.

142 A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada mediante amplificação de 10 amostras de
143 DNA selecionadas ao acaso, realizando-se amplificações durante três dias consecutivos, nas
144 mesmas condições citadas anteriormente.

145

146 **Análises físico-químicas**

147

148 A análise de composição química (proteína, lactose, gordura e caseína) do leite foi
149 determinada pela metodologia eletrônica baseado em espectrometria de infravermelho médio,
150 através do equipamento Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc., USA). A CCS foi obtida por
151 citometria de fluxo, em contador eletrônico Somacount 300 (Bentley Instruments Inc, USA).

152

153 **Análise estatística**

154

155 A identificação da presença ou não de *amplicons* de *Mycoplasma* spp., *Ma* e *Mm_{cluster}* foi
156 realizada por meio de observação direta dos produtos de PCR visualizados em gel de agarose,
157 seguida pela análise de frequência dos dados pelo procedimento PROC FREQ do SAS 9.1.3,
158 onde a frequência dos *amplicons* encontrados foi apresentada na forma de percentis (%).

159 Para a análise dos fatores de risco foi efetuada uma análise de qui-quadrado, onde se
160 observou a influência do sistema de criação e da raça sobre a presença de *Mycoplasma*,
161 utilizando o procedimento PROC FREQ do SAS 9.1.3.

162 Para verificar o efeito da positividade para *Ma* e *Mm_{cluster}* sobre as características de
163 composição e CCS foram realizadas análises de variância e testes de comparação de médias
164 utilizando-se o procedimento PROC GLM do SAS 9.1.3.

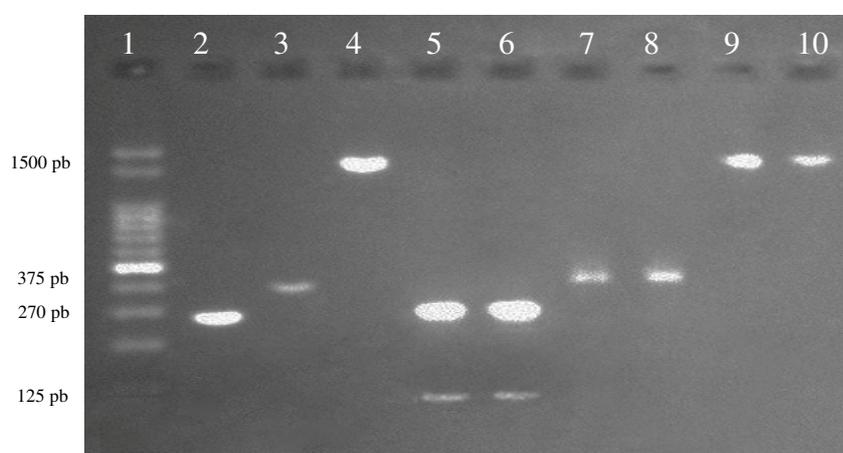
165

166

167 3. Resultados

168

169 A metodologia utilizada para extração de DNA das amostras de leite resultou em material
170 de boa qualidade para uso em ensaios de PCR, verificado pela amplificação do gene constitutivo
171 GAPDH em 98,63% (360/365). Este total foi utilizado para a PCR genérica e espécie-específica
172 (Figura 1).



173

174 **Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR genérica, PCR do
175 controle interno, PCR específica para *Mycoplasma agalactiae* e para *Mycoplasma mycoides*
176 cluster. 1: padrão de peso molecular; 2: *Mycoplasma* spp. (controle positivo); 3: *Mycoplasma*
177 *agalactiae* (controle positivo); 4: *Mycoplasma mycoides* cluster (controle positivo); 5 e 6:
178 amostras positivas para *Mycoplasma* spp. e GAPDH; 7 e 8: amostras positivas para
179 *Mycoplasma agalactiae*; 9 e 10: amostras positivas para *Mycoplasma mycoides* cluster.

180 A Tabela 2 apresenta a frequência de positividade para *Mycoplasma* spp., *Ma* e *Mm_{cluster}*.
 181 A ocorrência do gênero *Mycoplasma* foi de 46,42% (169/360) nos rebanhos avaliados, sendo
 182 que nos rebanhos localizados no estado de Pernambuco, variou de 18,18 a 89,80% e naqueles
 183 localizados no estado da Paraíba de 10,71 a 68,42%. Com relação à espécie *Ma*, constatou-se
 184 que 94,08% (159/169) das amostras foram positivas, com frequências variando de 66,67 a 100%
 185 (Tabela 2).

186

187 **Tabela 2.** Frequência absoluta e relativa de amostras de leite positivas para *Mycoplasma* spp.,
 188 *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster em cabras pertencentes a rebanhos nos
 189 estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.

Rebanho	n	<i>Mycoplasma</i> spp.		<i>Ma</i>		<i>Mm_{cluster}</i>	
		Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa*	Absoluta	Relativa*
A	47	19	40,43%	15	78,95%	3	15,78%
B	49	44	89,80%	44	100,0%	0	0,00%
C	25	14	56,00%	14	100,0%	0	0,00%
D	33	6	18,18%	4	66,67%	0	0,00%
E	60	33	55,00%	32	96,97%	17	51,51%
F	38	26	68,42%	25	96,15%	0	0,00%
G	52	16	30,77%	15	93,75%	1	6,25%
H	56	6	10,71%	5	83,33%	0	0,00%
Total	360	169	46,94%	159	94,08%	21	12,42%

190 *Ma* = *Mycoplasma agalactiae*; *Mm_{cluster}* = *Mycoplasma mycoides* cluster

191 * Frequência relativa do total de amostras positivas para o gênero.

192

193 Comportamento contrário ao observado para *Ma* foi verificado para *Mm_{cluster}*, sendo a
 194 maior parte das amostras negativas (87,58%) para esse micro-organismo. Como demonstrado na
 195 Tabela 2, apenas os rebanhos A, E e G apresentaram animais positivos para *Mm_{cluster}* com

196 frequência de 15,78, 51,51 e 6,25%, nessa ordem. Ressalta-se que dois animais no rebanho A,
197 16 no E e um animal no G, também foram positivos para *Ma*, simultaneamente.

198 A análise dos fatores de risco padrão racial e sistema de manejo foram associados com a
199 presença da bactéria nos rebanhos avaliados (Tabela 3).

200

201 **Tabela 3.** Análise de qui-quadrado dos fatores de risco padrão racial e sistema de criação em
202 cabras pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.

VARIÁVEL	<i>p</i>
Padrão racial	p<0,001
Sistema de manejo	p<0,001

203

204 A frequência da positividade de *Mycoplasma* spp., *Ma* e *Mm_{cluster}* por padrão racial está
205 apresentado na Tabela 4. Nota-se ocorrência de animais positivos em todos os grupos genéticos,
206 com maior frequência da espécie *Ma*.

207 Considerando o gênero *Mycoplasma*, destaca-se que todos os grupos genéticos
208 apresentaram amostras positivas para este agente, com frequências que variaram de 12,70%,
209 para a raça Murciana, a 77,42%, para a Marota (Tabela 4). A frequência para a espécie *Ma*
210 variou de 87,50%, em animais da raça Murciana, a 100%, para animais das raças Anglo-
211 Nubiana e Saanen sendo detectado pelo menos um animal positivo em cada padrão racial.
212 Amostras positivas para *Mm_{cluster}* só foram observadas nas raças Moxotó (18,28%), Parda
213 Sertaneja (1,92%) e para os animais SPRD (3,12%).

214 A comparação entre os valores médios dos parâmetros de composição e CCS entre
215 amostras positivas e negativas para *Ma* e *Mm_{cluster}* estão apresentados na Tabela 5. Observou-se
216 diferença estatística pelo teste t-Student (p<0,05) entre as médias de proteína, caseína e CCS de
217 amostras positivas e negativas para *Ma*. Para *Mm_{cluster}*, observou-se diferença estatística
218 significativa apenas para o parâmetro CCS.

219 No presente estudo os valores médios de caseína e proteína do leite apresentaram-se
220 superiores para as amostras positivas quando comparadas às negativas para o agente infeccioso

221 investigado em estudo. Nas amostras positivas para *Ma*, a média de proteína observada foi de
 222 3,6698% (Tabela 5). No entanto, 16,35% (26/159) estavam abaixo do mínimo exigido de 2,8%
 223 preconizado pela legislação em vigência. Para a caseína do leite, as médias obtidas para as
 224 amostras positivas foram de 3,0353 na avaliação de *Ma* (Tabela 5).

225 Foram observadas maiores médias de CCS em relação à positividade para *Ma* e *Mm*_{cluster}
 226 com valores de $2.043,2 \times 10^3$ e $2.803,4 \times 10^3$, respectivamente (Tabela 5). Nas amostras
 227 positivas para *Ma* e *Mm*_{cluster}, observaram-se valores individuais acima de 1.000×10^3
 228 células/mL em 52,12% (86/165) e 10,30% (17/165) das amostras positivas, respectivamente.

229

230 **Tabela 4.** Frequência absoluta e relativa de amostras de leite positivas para *Mycoplasma* spp.,
 231 *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides* cluster, de acordo com o padrão racial de
 232 cabras pertencentes a rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba.

Padrão racial	N	<i>Mycoplasma</i> spp.		<i>Ma</i>		<i>Mm</i> _{cluster}	
		Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.	Freq.
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa*	Absoluta	Relativa*
Anglo-Nubiana	13	8	61,54%	8	100,0%	0	0,00%
Marota	31	24	77,42%	23	95,83%	0	0,00%
Moxotó	93	39	41,94%	36	92,31%	17	18,28%
Murciana	63	8	12,70%	7	87,50%	0	0,00%
Parça Sertaneja	52	16	30,77%	15	93,75%	1	1,92%
Saanen	12	6	50,00%	6	100,0%	0	0,00%
SPRD	96	63	65,63%	59	93,65%	3	3,12%
Total	360	169	46,94%	159	94,08%	21	12,42%

233 *Ma* = *Mycoplasma agalactiae*; *Mm*_{cluster} = *Mycoplasma mycoides* cluster.

234 * Frequência relativa do total de amostras positivas para o gênero.

235

236

237 **Tabela 5.** Comparação entre médias de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de
 238 células somáticas (CCS) de amostras de leite de cabras positivas e negativas pertencentes a
 239 rebanhos nos estados de Pernambuco e Paraíba.

	Variável	Positivo	Negativo
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	Gordura	4,3180 ^A	4,1110 ^A
	Proteína	3,6698 ^A	3,4537 ^B
	Lactose	4,1948 ^A	4,2991 ^A
	Sólidos totais	13,1866 ^A	12,7778 ^A
	Caseína	3,0353 ^A	2,8115 ^B
	CCS (x1000)	2.043,2 ^A	1.388,7 ^B
<i>Mycoplasma mycoides</i> cluster	Gordura	4,2438 ^A	4,1993 ^A
	Proteína	3,8888 ^A	3,5277 ^A
	Lactose	4,1381 ^A	4,2604 ^A
	Sólidos totais	13,3021 ^A	12,9366 ^A
	Caseína	3,2281 ^A	2,8902 ^A
	CCS (x1000)	2.803,4 ^A	1.606,7 ^B

240 * Letras diferentes na mesma linha indicam $p < 0,05$ pelo teste t-Student.

241

242

243 4. Discussão

244

245 Foi detectada a presença de *Ma* e *Mm*_{cluster} em amostras de leite caprino, colhidas de
 246 rebanhos pertencentes aos estados de Pernambuco e Paraíba. Elevados valores de amostras
 247 positivas foram encontrados para a espécie *Ma*. Semelhante ao observado neste estudo, Souza
 248 (2013), avaliando rebanhos do estado de Pernambuco, demonstrou frequência de 75%, enquanto
 249 Barbosa et al. (2000) e Campos et al. (2009), analisando animais da Paraíba, observaram que
 250 83,2% dos animais foram positivos para *Ma*.

251 A elevada frequência de *Ma* observada nas populações avaliadas confirmam a maior
252 incidência da espécie e a destacam como o principal agente etiológico da agalaxia contagiosa
253 (Bergonier et al., 1997; Alcântara et al., 2013; Gómez-Martín et al., 2015), evidenciando a
254 importância da detecção deste micro-organismo e a necessidade de maior conhecimento sobre a
255 condição sanitária no momento da aquisição de novos animais, a fim de que estes não venham a
256 interferir sobre a sanidade e produtividade dos animais já existentes (Bandeira et al., 2008;
257 Alves et al., 2013; Kumar et al., 2014). Cuidado e atenção com o status sanitário de animais
258 quando de sua aquisição é imprescindível a todos os produtores de caprinos, mas,
259 particularmente, para os pequenos produtores, visto que os mesmos muitas vezes não
260 apresentam recurso financeiro para substituir o plantel ou para implementar procedimentos de
261 controle da doença e, nesses casos, a disseminação da doença irá acarretar maiores danos
262 (Azevedo et al., 2005).

263 A baixa ocorrência de *Mm_{cluster}* verificada nos rebanhos estudados sugere que a presença
264 de determinada espécie de *Mycoplasma* pode estar relacionada com fatores de riscos inerentes
265 ao animal e ao tipo de manejo (Ariza-Miguel et al. 2012; Khezri et al., 2014). Em estudo
266 realizado por Ariza-Miguel et al. (2012), na Espanha, *Ma* foi a única espécie detectada, embora
267 *M. mycoides* subsp. *capri* tenha sido relatada anteriormente (Al-Momani et al., 2011). A
268 ocorrência de *M. mycoides* subsp. *capri* também foi observada por Szeredi et al. (2003), Amores
269 et al. (2012) e Kumar et al. (2013) na Hungria, Jordânia e Índia, respectivamente. Na Nigéria,
270 Akwuobu et al. (2014) identificaram a presença das espécies *M. ovipneumoniae*, *M. arginini* e
271 *M. mycoides* subsp. *capri*. No Brasil, a maior parte dos trabalhos realizados para a detecção de
272 espécies associadas à ACOC, relatam a ocorrência de *Ma* (Azevedo et al., 2005, Bandeira et al.,
273 2008, Santos et al., 2015), sendo poucos os que detectaram a presença de *Mm_{cluster}* (Nascimento
274 et al., 1986; Barbosa et al., 2000).

275 Na avaliação dos fatores de risco, observou-se que o tipo de sistema de criação tem
276 influência sobre a presença da bactéria. Segundo Albenzio et al. (2002) a utilização da prática
277 de confinamento dos animais favorece ao aumento da exposição destes a um maior número de
278 agentes infecciosos, devido ao acúmulo de matéria orgânica e umidade nesses locais. No

279 presente estudo, os sistemas de criação dos tipos intensivo e semi-intensivo foram considerados
280 como um fator de risco. O manejo semi-intensivo e o intensivo apresentado pelos rebanhos A,
281 B, C, E, F, G e H pode ter facilitado a disseminação do agente etiológico dentro das
282 propriedades, fato este que pode ser corroborado pelas frequências elevadas observadas nas
283 mesmas. Bergonier et al. (1997) alertam que a transmissão de micoplasmas se dá através do
284 contato direto entre animais ou pela ingestão de alimentos e água contaminados por secreções
285 ou excreções de animais portadores, permitindo a rápida disseminação dentro do rebanho.

286 Uma prática importante para a aquisição de patógenos é o envio de animais para feiras e
287 exposições agropecuárias. De acordo com Bandeira et al. (2008) há uma associação entre
288 positividade para *Ma* e a participação em exposições e torneios leiteiros. Ressalta-se que os
289 animais dos rebanhos A, B, C, E, F, G e H participam periodicamente desses eventos,
290 possibilitando o contato com animais infectados e proporcionando a disseminação do micro-
291 organismo quando são reintroduzidos ao rebanho.

292 Os rebanhos D e H apresentaram as menores frequência de *Mycoplasma* spp., *Ma* e
293 *Mm_{cluster}*. Os menores valores obtidos pelos animais que compunham o rebanho D possivelmente
294 estão associados ao sistema de criação extensiva. A presença do agente infeccioso pode ser
295 justificada pela aquisição de animais de várias localidades para compor o rebanho, favorecendo
296 a introdução do agente.

297 Todas as propriedades avaliadas no presente estudo adquiriram seus animais de diferentes
298 regiões do país, além de comercializá-los para reprodução, o que representa um fator de risco
299 para a introdução e disseminação de agentes infecciosos em geral e de micoplasmas em
300 particular.

301 Neste estudo o padrão racial também foi considerado um fator de risco para a presença de
302 micoplasmas. É importante destacar que as maiores frequências encontradas para o gênero e a
303 espécie *Ma* foi verificada nos animais da raça Marota, podendo este fato estar relacionado ao
304 local de aquisição para compor o rebanho, uma vez que todos os animais foram originalmente
305 trazidos de diferentes regiões do país. Sabe-se que esses animais foram obtidos sem a exigência
306 de uma certificação negativa para essa bactéria por parte dos criadores dessas raças e sem uma

307 cuidadosa avaliação ou quarentena, antes da introdução ao rebanho. Além disso, esses animais
308 estavam submetidos a um sistema de criação do tipo semi-intensiva, o que provavelmente
309 permitiu a disseminação dentro de cada rebanho. Isso porque o principal reservatório de
310 micoplasma causadores de ACOC é o animal infectado, sendo a transmissão realizada por meio
311 do contato direto com os animais portadores do agente infeccioso, através da saliva, secreções
312 nasais ou oculares, leite, fezes, urina ou secreções de lesões articulares (Marinho, 2008).

313 Foi detectado *Mm_{cluster}* apenas nos padrões raciais Moxotó, Parda Sertaneja e SPRD. Os
314 animais SPRD foram adquiridos de outros estados e eram pertencentes a dois rebanhos distintos
315 que realizavam troca destes entre eles, o que pode ter facilitado a disseminação neste, sendo
316 facilitada também por um tipo de manejo intensivo. Já os animais da raça Parda Sertaneja não
317 tinham nenhum contato com outras raças, mas, possivelmente, a introdução de *Mm_{cluster}* pode
318 estar relacionada ao local de compra desses animais ou à participação em feiras.

319 A maior frequência de *Mm_{cluster}* foi observada na raça Moxotó. É importante ressaltar que
320 foram colhidas amostras de leite desta raça em dois rebanhos diferentes (rebanhos D e E), sendo
321 todas as amostras positivas para *Mm_{cluster}* pertencentes ao rebanho E. A propriedade E
322 apresentava um sistema de criação do tipo semi-intensivo, sendo os animais estabulados no
323 momento da ordenha e soltos na caatinga após esta. Possivelmente, o agente foi introduzido no
324 rebanho a partir da compra de animais infectados e a disseminação pela maior proximidade
325 entre animais infectados e sadios, facilitada pelo período de confinamento. Já os animais do
326 rebanho D, eram criados extensivamente, soltos na caatinga e, possivelmente, não entraram em
327 contato com animais portadores de *Mm_{cluster}*. Esta informação ressalta que o tipo de manejo
328 empregado está relacionado com a maior ou menor incidência da bactéria.

329 Apesar de considerar o efeito isolado da positividade para *Mycoplasma* sobre a
330 composição do leite de cabras, sabe-se que este pode ser influenciado por múltiplos fatores, tais
331 como: alimentação, raça, período de lactação, produção de leite, estação do ano, idade do
332 animal (Langoni et al., 2012; Almeida et al., 2013), além do estado sanitário no que se refere a
333 outros micro-organismos.

334 Com o intuito de auxiliar o setor produtivo do leite de cabra no Brasil, o Ministério da
335 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou a Instrução Normativa N° 37, de 31
336 de outubro de 2000, que regulamenta os novos padrões de identidade e qualidade do leite de
337 cabra, fixando valores mínimos de qualidade microbiológica, física e química (Brasil, 2000).

338 Observou-se que a comparação entre as amostras positivas e negativas diferiram para a
339 porcentagem de proteína e caseína, e valores de CCS nas amostras de leite avaliadas. Foram
340 observados maiores valores para proteína e caseína nas amostras de leite positivas para o agente
341 infeccioso em estudo. As altas concentrações de proteína, principalmente no que se refere à
342 caseína, são desejadas, uma vez que contribuem para uma melhor produção e coagulação de
343 queijos. No entanto, como o principal alvo da ACOC é a glândula mamária, ocasionando
344 diminuição drástica na produção de leite, levando a uma maior concentração destes
345 constituintes, em função de uma relação inversamente proporcional.

346 A CCS é um indicador do estado sanitário da glândula mamária e tem sido utilizada como
347 referência da saúde do úbere e da qualidade microbiológica de espécies caprinas (Pires et al.,
348 2015). No entanto, em cabras, a CCS deve ser utilizada com cautela no diagnóstico de mastite,
349 isso porque nestes animais ocorre uma intensa descamação do epitélio glandular (secreção
350 apócrina), com conseqüente aumento da quantidade de células somáticas no leite (Madureira et
351 al., 2010; Pires et al., 2015). Apesar da notável importância da CCS, a Instrução Normativa n°
352 37 de 31/10/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que trata
353 sobre o leite de cabra, não estabelece um limite para este parâmetro (Brasil, 2000). Tem sido
354 utilizado como base para leite caprino com mastite valores acima de 1.000×10^3 células/mL
355 (Paape et al., 2000; Paes et al., 2003), sendo a média de CCS para animais positivos e negativos
356 superior a esse valor no presente estudo. As amostras positivas para *Ma* e *Mm*_{cluster} apresentaram
357 maior CCS quando comparadas aos animais negativos. Aumento significativo na CCS foi
358 relacionado à presença de *Mycoplasma* por outros autores (Corrales et al., 2004; Contreras et al.,
359 2008).

360

361 **5. Conclusões**

362

363 A detecção de *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma mycoides*
364 cluster em amostras de leite caprino pertencentes a rebanhos localizados nos Estados de
365 Pernambuco e Paraíba, sugere a introdução de animais infectados nos rebanhos estudados, como
366 também o possível contato com os agentes etiológicos em feiras e exposições. Além disso, o
367 sistema de criação adotado na propriedade, provavelmente, influencia a disseminação da
368 infecção no rebanho.

369 Faz-se necessário a criação de um programa sanitário nacional que vise prevenir a
370 introdução e disseminação desse agente infeccioso em diferentes regiões do Brasil. Nesse
371 sentido, torna-se fator de urgência facilitar o acesso, dos criadores de caprinos, a técnicas
372 eficientes para a detecção precoce das principais espécies de *Mycoplasma* que acometem os
373 rebanhos caprinos a fim de evitar a disseminação e possibilitar o controle mais efetivo dentro e
374 entre os rebanhos, diminuindo assim as perdas econômicas no sistema de criação.

375

376

377 **6. Comitê de ética e biossegurança**

378

379 Experimento aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais – CEUA da Universidade
380 Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, processo 69-2014.

381

382

383 **7. Agradecimentos**

384

385 Às agências de fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq e a
386 FACEPE pelo financiamento do projeto.

387

388

389 **8. Referências bibliográficas**

- 390
391 Albenzio, A., Taibi, L., Muscio, A., Sevi, A., 2002. Prevalence and etiology of subclinical
392 mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk.
393 Small Rum. Res. 43 (3), 219-226.
394
395 Akwuobu, C.A., Ayling, R.D., Chah, K.F., Oboegbulem, S.I., 2014. Studies into the prevalence
396 of *Mycoplasma* species in small ruminants in Benue State, North-central Nigeria. Trop. Anim.
397 Health Prod. 46, 1087-1092.
398
399 Alcântara, M.D.B., Campos, A.C., Melo, M.A., Pereira Filho, J.M., Nascimento, E.R., Farias,
400 A.A., Sousa, D.R.M., Azevedo, E.O., 2013. Resposta imunológica em caprinos vacinados
401 contra agalaxia contagiosa. Pesq. Vet. Bras. 33 (5), 561-564.
402
403 Almeida, J.F., Aquino, M.H.C., Magalhães, H., Nascimento, E.R., Pereira, V.L.A., Ferreira, T.,
404 Barreto, M.L., 2013. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho
405 caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Arq. Inst. Biol. 80 (1), 13-18.
406
407 Al-Momani, W., ABO-Shehada, M.N., Raj, N., 2011. Seroprevalence of and risk factors for
408 *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* infection in small ruminants in northern Jordan. Trop
409 Anim. Health Prod., 43, 463-9.
410
411 Alves, B.H.L.S., Silva, J.G., Mota, A.R., Campos, A.C., Pinheiro Júnior, J.W., Santos, S.B.,
412 Mota, R.A., 2013. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco State,
413 Brazil. Pesq. Vet. Bras. 33 (11), 1309-1312.
414
415 Amores, J., Sánchez, A., Gómez-Martín, A., Corrales, J.C., Conteras, A., De La Fe, C., 2012.
416 Surveillance of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in dairy goat
417 herds. Small Rum. Res. 102, 89-93.
418
419 Ariza-Miguel, J., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., 2012. A survey of *Mycoplasma*
420 *agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. BMC Vet. Res. 8, 1-6.
421
422 Azevedo, E.O., Alcântara, M.D.B., Nascimento, E.R., Tabosa, I.M., Barreto, M.L., Almeida,
423 J.F., Araújo, M.D., Rodrigues, A.R.O., Riet-Correa, F., Castro, R.S., 2006. Contagious
424 Agalactia by *Mycoplasma Agalactia* in Small Ruminants in Brazil: first report. Braz. J.
425 Microbiol. 37, 576-581.
426
427 Bandeira, D.A., Castro, R.S., Azevedo, E.O., Nascimento, E.R., Melo, L.S.S., Melo, C.B., 2008.
428 Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba
429 State, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60 (5), 1255-1258.
430
431 Barbosa, V.P., Nascimento, E.R., Danelli, M.G.M., Nascimento, M.G.F., Santos, M.A.J.,
432 Lignon, G.B., Ribeiro, V.R., 2000. Diferenciação de tipos de *Mycoplasma mycoides* na
433 etiopatogenia da micoplasmose caprina. Rev. Bras. Med. Vet. 7 (1), 33-36, 2000.
434
435 Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K., Gould, A.R., 1994. A PCR-based test for the specific
436 identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. J. Vet. Diagn. Invest. 6, 428-
437 434.
438
439 Bergonier, D., Berthelot, X., Poumarat, F., 1997. Contagious agalactiae of small ruminants:
440 current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. 16 (3), 848-
441 873.
442

- 443 Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E.,
444 Noordaa, J.V.D., 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin.*
445 *Microbiol.* 28 (3), 495-503.
446
- 447 Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.
448 Regulamento Técnico de Produção, identidade e qualidade do leite de cabra. Instrução
449 Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, 8 de novembro de
450 2000.
451
- 452 Campos, A.C., Telesb, J.A.A., Azevedo, E.O., Nascimento, E.R., Oliveira, M.M.M.,
453 Nascimento, S.A., Castro, R.S., 2009. ELISA protein G for the diagnosis of contagious
454 agalactia in small ruminants. *Small Rum. Res.* 84, 70-75.
455
- 456 Contreras, A., Miranda, R.E., Sánchez, A., De La Fe, C., Sierra, D., Luengo, C., Corrales, J.C.,
457 2008. Presence of *Mycoplasma* species and somatic cell counts in bulk-tank goat milk. *Small*
458 *Rum. Res.* 75, 247–251.
459
- 460 Cordeiro, C.A.M., Carlos, L.A., Martins, M.L.L. 2002. Qualidade microbiológica do leite
461 pasteurizado tipo C proveniente de micro-usinas de Campos - RJ. *Hig. Alim.* 16 (92-93), 41-44.
462
- 463 Corrales, J.C., Sánchez, A., Luengo, C., Poveda, J.B., Contreras, A., 2004. Effect of clinical
464 contagious agalactia on the bulk-tank milk somatic cell count in murciano-granadina goat herds.
465 *J. Dairy Sci.* 87 (10), 3165–3171.
466
- 467 Fonseca, L. F. L., Santos, M. V., 2000. Qualidade do leite e controle da mastite, Lemos
468 Editorial, São Paulo.
469
- 470
- 471 Gomes, H. A., Gallo, C. R., 1995. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de
472 enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo
473 “Minas frescal” comercializados em Piracicaba-SP. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 15 (2), 158-161.
474
- 475 Gómez-Martín, A., Uc, N., Vieira, L.A, Gadea, J., Cadens, J., Sánchez, A., De La Fe, C., 2015.
476 Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* in the
477 diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. *Theriogenology* 83, 911–919.
478
- 479 Khezri, M., Pourbakhsh, S.A., AShtari, A., Rokhzad, B., 2014. A survey of *Mycoplasma*
480 *agalactiae* in small ruminants with contagious agalactiae syndrome in Iran. *Bangladesh J. Vet.*
481 *Med.* 12 (1), 67-72.
482
- 483 Kumar, A., Rahal, A., Chakraborty, S., Verma, A.K., Dhamas, K., 2014. *Mycoplasma*
484 *agalactiae* an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. *Vet.*
485 *Med. Int.* 2014, 1-13.
486
- 486 Kumar, V., Rana, R., Mehra, S., Rout, P.K. 2013. Isolation and Characterization of *Mycoplasma*
487 *mycoides* Subspecies *capri* from Milk of Natural Goat Mastitis Cases. *ISRN Vet. Sc.* 2013.
488
- 489 Kuppeveld, F. J. M., Logt, J. T. M., Angulo, A. F., Zoest, M. J., Quint, W. G. V., Niesters, H.
490 G. M., Galama, J. M. D., Melchers, W. J. G., 1992. Genus and species-specific identification of
491 *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (8), 2606-2615.
492
- 493 Langoni, H., Citadella, J.C.C., Machado, G.P., Faccioli, P.Y., Lucheis, S.B., Silva, A.V., 2012.
494 Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. *Vet. Zootec.* 19
495 (1), 115-122.
496

- 497 Madureira, K.M., Gomaes, V., Castro, R.S., Kitamura, S.S., Araújo, W.P., 2010. Análise das
498 metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híidas.
499 Pesq. Vet. Bras. 30 (4), 311-316.
500
- 501 Marinho, M.L., 2008. Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* em caprinos
502 com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos. 113p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária)
503 – Universidade Federal Rural de Pernambuco – PE.
504
- 505 Nascimento, E.R., Nascimento, M.G.F., Freundt, E.A., Andersen, H., 1986. Isolation of
506 *Mycoplasma mycoides* from Outbreaks of caprine mycoplasmosis in brazil. Br. vet. 1 (142),
507 246-257.
508
- 509 Nicholas, R.; Ayling, R.; mcauliffe, L. *Mycoplasma diseases of ruminants*. CABI, Wallingford,
510 UK; 239 p., 2008.
511
- 512 Paape, M.J. Situation regarding the legal limit for somatic cell counts for goats in the United
513 States, 2000. In: Proceedings of the 7th International Conference on Goats, France, 2000, Tours.
514 Tours, 2000. p.755-6.
515
- 516 Paes, P.R.O., Lopes, S.T.A., Lopes, R.S., Kohayagawa, A., Takahira, R.K, Langoni, H., 2003.
517 Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células
518 somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. Arq.
519 Bras. Med. Vet. Zootec. 55 (1), 15-20.
520
- 521 Pires, A., Sobral, P., Gomes, A., Pardal, P., 2015. Qualidade higiênica do leite de caprinos da
522 raça serrana, ecótipo ribatejano, explorados na região do Ribatejo e Oeste. Rev. UIIPS 3, 175-
523 191.
524
- 525 Ravazzolo, A.P., Nenci, C., Vogt, H.R., Waldvogel, A., Obexer-Ruff, G., Peterhans, E., Bertoni,
526 G., 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA
527 expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus.
528 Virol. J. 350, 116–127.
529
- 530 Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.
531 Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1094-1156.
532
- 533 Santos, L.M.M, Pereira, C.S., Machado, L.S., Almeida, J.F., Nascimento, E.R., 2012. Queda na
534 produção de leite de cabras por suto de micoplasmose. Enciclop. Biosfera 8 (15), 1510.
535
- 536 Santos, O.M., Campos, A.C., Santos, J.P., Santos, O.M., Caldas, E.L.C., Santos, A.D.F.,
537 Nascimento, E.R., Castro, R.S., Azevedo, E.O., 2015. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos
538 do Estado de Sergipe: dados preliminares. Scientia Plena 11, 4.
539
- 540 SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1.3, Cary (NC): SAS Institute Inc.
541 2006.
542
- 543 Silva, N.S., Marinho, M.L., Azevedo, E.O., Campos, A.C., Carvalho, M.G.X., 2013.
544 Tratamento alopático e homeopático em caprinos com agalaxia contagiosa: estudo comparativo.
545 Arch. Vet. Sci. 18 (4) 57-64.
546
- 547 Souza, F.D.N., 2013. Detecção de *Ureoplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* pela técnica da
548 reação em cadeia da polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos. 43p. Dissertação
549 (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) – Universidade Federal Rural de
550 Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns.
551

- 552 Szeredi, L., Tenk, M., Dan, A., 2003. Infection of two goatherds with *Mycoplasma mycoides*
553 subsp. *capri* in Hungary, evidence of a possible faecal excretion. J. Vet. Med. B. Infect. Dis.
554 Vet. Public. Health 50, 172-177.
555
- 556 Todaro, M., Puleio, R., Sabelli, C., Scatassa, M.L., Console, A., Loria, G.R., 2015.
557 Determination of milk production losses in Valle del Belicesheep following experimental
558 infection of *Mycoplasma agalactiae*. Small Rum. Res. 123, 167–172.
559
- 560 Tola, S., Angioi, PP., Rocchigiani, AM., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Leori, G., 1997.
561 Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Vet.
562 Microbiol. 54, 17-22.
563
- 564 Wang, H., Ni, L., Yang, H., Xu, L., Ma, N., Ding, H., 2014. Isolation and identification of
565 *Mycoplasma mycoides* cluster strains from goats in Chongqing, China. Bull. Vet. Inst. Pulawy,
566 58, 11-15.
567
- 568 WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. 2006. Contagious Agalactia.
569 <http://http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2006/> (acessado em
570 22.04.2016).

CAPÍTULO III

Diversidade do gene GoLA-DRB.2 e sua associação com características do leite em caprinos nativos e exóticos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Nordeste do Brasil

1 **Diversidade do gene GoLA-DRB.2 e sua associação com características do leite em**
2 **caprinos nativos e exóticos nos estados de Pernambuco e Paraíba, Nordeste do**
3 **Brasil**

4
5
6 **Resumo:** O Antígeno Leucocitário Caprino (GoLA) é uma região do genoma caprino
7 que tem recebido atenção por desempenhar ação na resposta imunológica e nas
8 características de produção e qualidade do leite. O objetivo do presente estudo foi o de
9 identificar e associar os polimorfismos do gene GoLA-DRB.2 em 181 fêmeas caprinas
10 de diferentes raças provenientes dos estados de Pernambuco e da Paraíba. A frequência
11 alélica encontrada para a população total com a enzima *PstI* foi de A igual a 0,7254 e B
12 a 0,2746, sendo as frequências dos genótipos AA, AB e BB de 0,6740, 0,0387 e 0,2873,
13 respectivamente. As frequências alélicas obtidas a partir da digestão com a enzima *TaqI*
14 foi de C = 0,8149 e D = 0,1851, sendo as frequências dos genótipos: 0,7403 (CC),
15 0,1492 (CD) e 0,1105 (DD), com predominância do genótipo CC em todos os padrões
16 raciais avaliados. Os valores de Heterozigosidade observada foram menores do que os
17 encontrados para Heterozigosidade esperada em todas as populações testadas, com
18 rebanhos fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve variação genética significativa
19 entre raças, entre indivíduos da mesma raça e dentro da população. Não houve diferença
20 significativa entre os genótipos e os padrões de haplótipos sobre os valores de gordura,
21 proteína, lactose, sólidos totais, caseína e contagem de células somáticas. O gene
22 GoLA-DRB.2 foi polimórfico na avaliação com as enzimas *PstI* e *TaqI* estudadas, mas
23 não desempenhou efeitos sobre nenhuma das características de composição e contagem
24 de células somáticas avaliadas.

25
26 **Palavras chave:** Caprinos. CCS. Complexo Principal de Histocompatibilidade.
27 Composição. DRB|*PstI*, DRB|*TaqI*.

28
29
30 **Introdução**

31
32 A caprinocultura de leite no Nordeste do Brasil vem se consolidando como
33 atividade rentável, conquistando novos mercados e despertando o interesse de muitos

34 produtores rurais, sendo uma alternativa viável para a agricultura familiar, ocasionando
35 aumento no efetivo total de caprinos e na produção de leite de cabra.

36 Apesar da ascensão da atividade e a sua importância para o desenvolvimento
37 socioeconômico do país, tem-se verificado problemas relativos à sanidade animal, o que
38 tem prejudicado o desempenho produtivo e econômico da atividade. Com o intuito de
39 diminuir esse impacto, tem-se dedicado grande atenção na identificação de genes ou
40 regiões cromossômicas e suas associações com a resistência à doenças.

41 Uma região do genoma caprino que apresenta papel central na resistência a
42 doenças é o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). O MHC é um
43 complexo de genes que desempenham um papel vital no sistema imunológico,
44 geralmente encontrado nos vertebrados, sendo na espécie caprina denominado de região
45 GoLA (*Goat Lymphocyte Antigen*) ou CLA (*Caprine Lymphocyte Antigen*) (Dongxiao
46 & Yuan, 2004; Baghizadeh et al., 2009; Radwan et al., 2010; Zhao et al., 2011).

47 Os produtos dos genes localizados na região GoLA estão divididos em três classes
48 com base em diferenças nas suas funções: Classe I, Classe II e Classe III, sendo as
49 Classes I e II as que apresentam maior diversidade polimórfica (Baghizadeh et al., 2009,
50 Zhao et al., 2011; Paracha et al., 2015). Os genes da Classe I são encontrados na
51 superfície das células do organismo, enquanto que os da Classe II são expressos em
52 células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos (Ahmed & Othman,
53 2006; Zhao et al., 2011). Os genes DR da Classe II foram os mais bem caracterizados e
54 o segundo éxon do gene DRB (GoLA-DRB.2) é a região mais estudada devido ao seu
55 elevado polimorfismo e por ser considerado responsável pelas diferenças na resposta
56 imunológica dos indivíduos aos agentes infecciosos (Baghizadeh et al., 2009; Paracha et
57 al., 2015).

58 O estudo do polimorfismo do gene GoLA-DRB.2 e a identificação de variações
59 alélicas específicas podem contribuir para desenvolvimento de marcadores genéticos
60 para identificação e incorporação nos rebanhos de características de resistência a
61 doenças, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de criação de cabras
62 leiteiras (Shrivastava et al., 2015).

63 Pesquisas têm demonstrado que vários alelos do gene DRB.2 em bovinos estavam
64 associados com maior contagem de células somáticas (CCS) e alta incidência de mastite
65 (Dietz et al., 1997; Zhang et al., 2007; Chu et al., 2012). A maioria dos estudos
66 genéticos focados em leite utiliza a CCS e a mastite clínica como medida fenotípica
67 para prever o status de bactérias no úbere (Rupp & Boichard, 2003). A correlação

68 genética existente entre a CCS e a mastite, tanto clínica como subclínica, é estimada em
69 torno de 0,3 a 0,7, com herdabilidade de 0,10 a 0,14 para a CCS (Shook & Schutz,
70 1994), sendo esta uma variável que deve ser levada em consideração em programas de
71 melhoramento genético, com o objetivo de elevar a resistência à mastite.

72 Além disso, esse gene tem sido relacionado com uma ampla variedade de
73 características de produção e para seleção de características de segurança e qualidade do
74 leite em animais domésticos (Paracha et al., 2015).

75 Ao contrário dos avanços verificados nos estudos realizados em vacas leiteiras, a
76 pesquisa sobre a genética da resistência à mastite em cabras ainda é escassa e pouco se
77 sabe sobre a frequência alélica desse gene e as possíveis associações entre os seus alelos
78 com características de interesse econômico (Petlane et al., 2012; Shrivastava et al.,
79 2015).

80 Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a diversidade do
81 gene GoLA-DRB.2 e a sua associação com características de composição e contagem
82 de células somáticas do leite de cabras nativas e exóticas pertencentes a rebanhos
83 localizados nos estados de Pernambuco e Paraíba, região Nordeste do Brasil.

84

85

86 **Material e métodos**

87

88 Animais e colheita das amostras

89

90 Foram selecionadas 181 fêmeas caprinas de diferentes raças exóticas e nativas,
91 sendo 81 animais provenientes do estado de Pernambuco e 100 do estado da Paraíba
92 (Tabela 1). O período de colheita ocorreu de julho de 2014 a julho de 2015.

93 Para obtenção de DNA genômico e análises do leite, as amostras individuais
94 foram colhidas após antissepsia dos tetos dos animais com álcool 70%, seguida pelo
95 descarte dos primeiros jatos de leite. Cada amostra de leite foi armazenada em
96 recipientes de polipropileno estéreis e devidamente identificada. Os recipientes foram
97 armazenados em caixas isotérmicas e encaminhados ao Laboratório de Qualidade do
98 Leite, do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE),
99 localizado no Departamento de Zootecnia - UFRPE, para análises físico-químicas e ao
100 Laboratório de Biologia Molecular da Central de Laboratórios da Unidade Acadêmica
101 de Garanhuns (UFRPE/UAG), para análises moleculares.

102 **Tabela 1.** Número de amostras (N) por padrão racial e origem das populações
103 estudadas.

Padrão Racial	N	Grupo	Origem	Sigla
Anglo Nubiana	7	Exótica	Pernambuco	ANG
Marota	10	Nativa	Paraíba	MAR
Moxotó	38	Nativa	Pernambuco/Paraíba	MOX
Murciana	23	Exótica	Paraíba	MUR
Parda Sertaneja	36	Nativa	Paraíba	PAR
Sem padrão racial definido	67	Nativa	Pernambuco	SPRD

104

105 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

106

107 A extração de DNA das amostras de leite foi realizada pelo método de
108 sílica/isotiocianato de guanidina segundo metodologia descrita por Boom et al. (1990).
109 A qualidade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose a 1%, visualizado em luz
110 ultravioleta e fotodocumentado.

111 O DNA genômico foi submetido à amplificação do éxon 2 do gene GoLA-DRB
112 seguindo a metodologia descrita por Amillis et al. (1995). Os oligonucleotídeos
113 iniciadores utilizados para a amplificação foram DRB 1.1 (5' - TAT CCC GTC TCT
114 GCA GCA CAT TTC - 3') e DRB 1.2 (5'-TCG CCG CTG CAC ACT GAA ACT CTC-
115 3') para amplificação de um segmento gênico de 285 pares de base (pb).

116 As reações de PCR foram realizadas em volume final de 35µL, sendo esta
117 constituída por 100ng de DNA, 25µL do mix de PCR (PCR Supermix Brasil da
118 Invitrogen, USA) e 10µM de cada um dos *primers* descritos acima e 4µL de água. A
119 amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® Pro* (Eppendorf, Germany)
120 constituída de uma etapa de desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos
121 de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 64°C para anelamento dos *primers* e 1 minuto a 72°C
122 para extensão, permanecendo em extensão final por 7 minutos a 72°C.

123

124 Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP)

125

126 A genotipagem dos animais para o fragmento de 285 pb do gene GoLA-DRB.2
127 resultante da amplificação pela técnica de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de
128 restrição *PstI* e *TaqI*, em duas reações separadamente (Tabela 2).

129 As reações de digestão com a *PstI* foram constituídas por 4 U (0,4µL) da *PstI*, 8
 130 µL do *amplicon*, 1,6µL do tampão e 18µL de água ultrapura, totalizando 28µL. Já a
 131 digestão com a *TaqI* foi constituída por 4 U (0,4µL) de *TaqI*, 8 µL do *amplicon* , 0,7µL
 132 do tampão, 0,7µL de BSA e 7,3µL de água ultrapura, com volume total de 17,1µL.

133 Essas reações foram realizadas em termociclador programado segundo
 134 recomendações do fabricante. Para *PstI* foi utilizado um único ciclo para a digestão a
 135 37°C por três horas, seguido pela inativação da enzima pelo acréscimo de 2µL de EDTA
 136 (*Ethylene diamine tetra acetic acid*) a 0,5M. Na digestão com *TaqI* foram realizados
 137 dois ciclos, sendo o ciclo inicial para a digestão a 65°C por três horas, seguido pela
 138 inativação da enzima por uma etapa de 20 minutos a 80°C.

139 Os produtos digeridos (10 µL) foram analisados em gel de agarose a 3%,
 140 visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentados.

141

142 **Tabela 2.** Genótipos obtidos por PCR-RFLP do segundo éxon do gene GoLA-DRB.2.

Enzima de Restrição	Genótipos		
<i>PstI</i>	AA (226/44/15 pb)	AB (270/226/44/15 pb)	BB (270/15 pb)
<i>TaqI</i>	CC (163/122 pb)	CD (285/163/122 pb)	DD (285 pb)

143

144 Análises físico-químicas

145

146 Os constituintes do leite (proteína, lactose, gordura e caseína) foram determinados
 147 pela metodologia eletrônica baseado no espectrômetro de infravermelho médio (IDF,
 148 1996), por meio do equipamento Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc., USA). A
 149 contagem de células somáticas foi obtida por citometria de fluxo (IDF, 1995), em
 150 contador eletrônico Somacount 300 (Bentley Instruments Inc., USA).

151

152 Análises estatísticas

153

154 A identificação dos genótipos e dos padrões de haplótipos foi realizada através de
 155 observação direta a partir dos produtos de PCR-RFLP para cada enzima de restrição
 156 testada em gel de agarose a 3%, seguida de análise das frequências alélicas, genotípicas
 157 e haplotípicas pelo procedimento PROC FREQ do SAS 9.1.3 (SAS Institute, 2006).

158 Os índices genéticos populacionais, tais como: heterozigosidades observadas (H_o)
159 e esperadas (H_e), o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), a análise de
160 variância molecular (AMOVA) e a estatística F de Wright foram calculados com o
161 software Arlequin versão 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

162 Os efeitos dos genótipos e haplótipos sobre as características do leite (composição
163 do leite e CCS) foram estimados utilizando o procedimento PROC GLM do SAS 9.1.3
164 (SAS Institute, 2006).

165

166

167 **Resultados e Discussão**

168

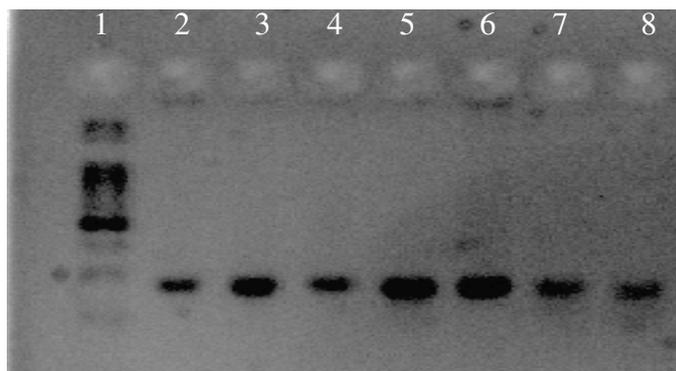
169 Polimorfismos do gene GoLA-DRB.2

170

171 Os fragmentos do gene GoLA-DRB.2 estão apresentado na Figura 1. Todas as
172 amostras de DNA testadas apresentaram amplificação do produto de 285 pb, como
173 relatado na literatura (Ahmed & Othman, 2006; Baghizadeh et al., 2009; Singh et al.,
174 2012).

175 Os Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP, do inglês
176 *Restriction fragment length polymorphism*) foram detectados com as enzimas de
177 restrição *PstI* e *TaqI* e estão expostos na Figura 2.

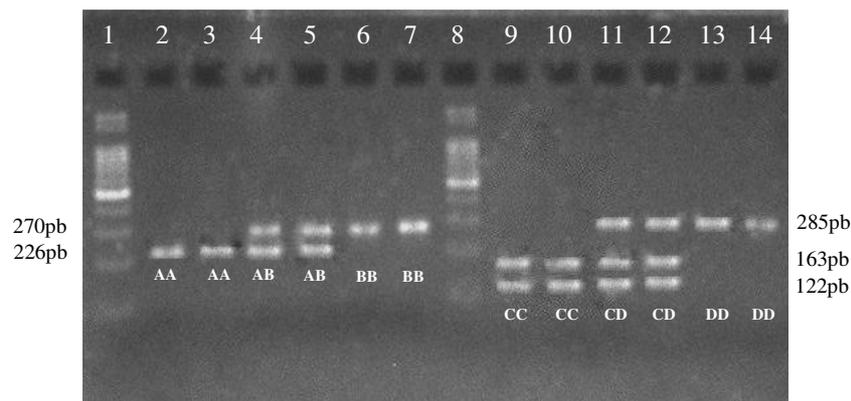
178



179

180 **Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos por PCR (*primers* DRB
181 1.1/DRB 1.2) da região do éxon 2 do gene DRB.2 em cabras leiteiras. 1: padrão de peso
182 molecular de DNA 100pb; 2 a 8: amostras GoLA-DRB.2.

183



184

185 **Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão com as enzimas *PstI*
 186 e *TaqI* do gene DRB.2 em cabras leiteiras. 1 e 8: padrão de peso molecular de DNA
 187 100pb; 2 a 7: amostras digeridas com *PstI*; 9 a 14: amostras digeridas com *TaqI*.

188

189 As frequências alélicas e genóticas do éxon 2 do gene GoLA-DRB na população
 190 geral e nos nove padrões raciais avaliados estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

191 Segundo Petlane et al. (2012), em caso de haver polimorfismos, os padrões de
 192 restrição esperados para DRB|*PstI* seriam 226pb e 44pb e 15pb (para sítios de restrição
 193 A) ou 270pb e 15pb (para sítios de restrição B). No presente estudo o locus avaliado foi
 194 polimórfico para a endonuclease de restrição *PstI*, apresentando dois alelos (A e B) e
 195 três genótipos (AA, AB e BB). Pequenos fragmentos de tamanho 44pb e 15pb não
 196 foram visualizados em gel. As frequências alélicas observadas para a enzima *PstI* na
 197 população total de cabras leiteiras foi de A = 0,7254 e B = 0,2746 (Tabela 3). As
 198 frequências genóticas encontradas para AA, AB e BB foram de 0,6740, 0,0387 e
 199 0,2873, respectivamente. Elevadas frequências do alelo A em cabras também foram
 200 observados por outros autores (Amills et al., 1995; Ahmed & Othman, 2006;
 201 Baghizadeh et al., 2009). No entanto, Ahmed & Othman (2006) ao analisarem os
 202 polimorfismos genéticos em uma população de cabras Egípcias não observaram a
 203 presença do genótipo AA na população avaliada.

204

Os padrões de restrição esperados para a enzima DRB|*TaqI* são 163 pb e 122 pb
 205 (sítio de restrição C) ou 285 pb (sítio de restrição D) (Singh et al., 2012). O locus
 206 DRB|*TaqI* foi polimórfico no presente estudo, apresentando uma frequência alélica para
 207 a população total de C = 0,8149 e D = 0,1851, sendo as frequências dos genótipos:
 208 0,7403 (CC), 0,1492 (CD) e 0,1105 (DD). Baghizadeh et al. (2009) observaram
 209 frequências alélicas iguais a 0,68 e 0,32 para C e D, respectivamente, quando

210 investigando o éxon 2 do gene DRB em cabras no Irã. Enquanto que Singh et al. (2012)
 211 observaram valores próximos entre os alelos C (0,505) e D (0,495) em cabras na Índia.

212 As frequências genotípicas e alélicas apresentadas na avaliação utilizando os dois
 213 *loci* descritos acima sugerem que as variações encontradas entre as do presente estudo e
 214 os relacionados na literatura podem estar associadas ao fato de que cada população é
 215 mantida em distintas condições ambientais, sendo submetidas conseqüentemente a
 216 diferentes forças evolutivas que vão atuar de forma particular em cada população
 217 (Yadav et al., 2016).

218

219 **Tabela 3.** Frequências alélicas e genotípicas da população total de cabras leiteiras.

Locus	Número	Alélica		Genotípica		
		A	B	AA	AB	BB
DRB <i>Pst</i> I	181	0,7254	0,2746	0,6740	0,0387	0,2873
		C	D	CC	CD	DD
DRB <i>Taq</i> I	181	0,8149	0,1851	0,7403	0,1492	0,1105

220

221

222 Ao realizar a avaliação das frequências alélicas e genotípicas por padrão racial,
 223 observou-se que animais da raça MAR foram monomórficos para DRB|*Pst*I (Tabela 4),
 224 estando disponível apenas o alelo A e conseqüentemente resultando apenas no genótipo
 225 AA. O monomorfismo observado nos animais MAR implica em menor possibilidade
 226 futura de exploração da diversidade genética quando da utilização dessa raça. Na análise
 227 dos demais padrões raciais foi observada a presença de três genótipos (AA, AB e BB) e
 228 dois alelos (A e B), com maior frequência do genótipo AA para todos os padrões raciais
 229 avaliados, variando entre 0,4925 (SPRD) a 0,8684 (MOX), o que pode indicar a seleção
 230 voltada para o alelo A nesse loco. Essa maior frequência não foi verificada por Singh et
 231 al. (2012), que obteve valor de 0,054 para AA, enquanto que valores iguais a 0,222 e
 232 0,724 foram obtidos para os genótipos AB e BB, respectivamente. Na avaliação de
 233 polimorfismos genéticos do gene DRB realizado por Ahmed & Othman (2006), o
 234 genótipo AA não foi observado em cabras Egípcias por PCR-RFLP. DRB|*Pst*I não
 235 exibiu padrão heterozigoto para animais da raça ANG. Essa deficiência em genótipos

236 heterozigóticos observados no presente estudo, provavelmente está associada a uma
237 pequena amostragem para essa raça.

238 Na análise de restrição *DRB|TaqI* observou-se monomorfismo para os animais da
239 raça ANG (Tabela 4). Polimorfismos foram observados nos demais padrões raciais
240 estudados, exibindo dois alelos (C e D) e três genótipos (CC, CD, DD). Maior
241 frequência de homozigotos dominantes foi observada em todas as raças polimórficas
242 avaliadas, com valores entre 0,5217 (MUR) e 0,9444 (PAR). Esta observação sugere
243 que a seleção favorecendo o alelo C pode estar ocorrendo neste loco. Estes valores
244 corroboram com o apresentado por outros autores (Ahmed & Othman, 2006;
245 Baghizadeh et al., 2009). Maior frequência para o alelo C foi observada nas raças MOX
246 (0,9535) e PAR (0,9595).

247

248 **Tabela 4.** Frequências alélicas e genotípicas em cabras leiteiras de diferentes padrões
249 raciais.

Locus	Padrão racial	Nº	Frequência alélica		Frequência Genotípica		
			A	B	AA	AB	BB
<i>DRB PstI</i>	ANG	7	0,5714	0,4286	0,5714	0,0000	0,4286
	MAR	10	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
	MOX	38	0,8684	0,1316	0,8684	0,0263	0,1053
	MUR	23	0,5435	0,4565	0,5217	0,0435	0,4348
	PAR	36	0,8611	0,1389	0,8333	0,0556	0,1111
	SPRD	67	0,5149	0,4851	0,4925	0,0448	0,4627
<i>DRB TaqI</i>			C	D	CC	CD	DD
	ANG	7	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
	MAR	10	0,8500	0,1500	0,8000	0,1000	0,1000
	MOX	38	0,9474	0,0526	0,9211	0,0526	0,0263
	MUR	23	0,6087	0,3913	0,5217	0,1739	0,3043
	PAR	36	0,9583	0,0417	0,9444	0,0278	0,0278
SPRD	67	0,7090	0,2910	0,5672	0,2836	0,1493	

250 Legenda: ANG = Anglo Nubiana; MAR = Marota; MOX = Moxotó; MUR = Murciana; PAR =

251 Parda Sertaneja; SPRD = Sem padrão racial definido.

252

253 As frequências dos haplótipos do gene GoLA-DRB.2 a partir da combinação dos
 254 dois *loci* avaliados (*PstI* e *TaqI*) estão apresentados na Tabela 5. Nota-se a formação de
 255 nove haplótipos, sendo as maiores frequências encontradas para AACC em todos os
 256 padrões raciais analisados. Verifica-se também que a maior frequência foi encontrada
 257 para a combinação AACC na raça MOX e a menor para ABCD em animais SPRD. A
 258 combinação ABDD não foi observada no presente estudo, sendo que os animais SPRD
 259 apresentaram todos os outros padrões. Este fato possivelmente está associado a maior
 260 disponibilidade de alelos ao cruzar animais de diferentes raças. Entre animais puros,
 261 maior número de haplótipos foi verificado na raça MUR.

262

263 **Tabela 5.** Frequências dos haplótipos em cabras leiteiras de diferentes padrões raciais.

Padrão racial	n	Haplótipos								
		AACC	AACD	AADD	ABCC	ABCD	ABDD	BBCC	BBCD	BBDD
ANG	7	0,5714	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4286	0,0000	0,0000
MAR	10	0,8000	0,1000	0,1000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MOX	38	0,8422	0,0000	0,0263	0,0263	0,0000	0,0000	0,0526	0,0526	0,0000
MUR	23	0,3479	0,0869	0,0869	0,0000	0,0435	0,0000	0,1739	0,0448	0,2174
PAR	36	0,7778	0,0278	0,0278	0,0555	0,0000	0,0000	0,1111	0,0000	0,0000
SRD	67	0,2687	0,1343	0,0896	0,0299	0,0149	0,0000	0,2686	0,1343	0,0597

264 Legenda: n = Número de animais; ANG = Anglo nubiana; MAR = Marota; MOX = Moxotó;
 265 MUR = Murciana; PAR = Parda Sertaneja; SRD = Sem raça definida.

266

267

268 Diversidade Genética

269

270 Os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), além do teste do
 271 equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) estão apresentados na Tabela 6. Na análise das
 272 duas enzimas de restrição, observaram-se valores baixos de H_o , com os menores valores
 273 encontrados para as raças ANG e MOX, sendo respectivamente de 0,0000 e 0,0263 para
 274 DRB|*PstI* e de 0,0278 e 0,0526 para DRB|*TaqI*. Observa-se ainda que valores de H_o
 275 foram menores do que os encontrados para H_e em todas as populações polimórficas
 276 testadas, indicando uma menor quantidade de heterozigotos na população do que
 277 esperado pelo EHW, o que pode ocasionar endogamia ou a fixação de alelos (Sánchez,
 278 2008). Shrivastava et al. (2015) também observaram valor de H_e maior do que H_o ,

279 quando avaliando caprinos na Índia utilizando a enzima de restrição *TaqI*. De forma
 280 geral, DRB|*TaqI* obteve maior He na população avaliada quando comparada com
 281 DRB|*PstI*.

282 Pelo teste de qui-quadrado (χ^2 , 0,05, 1) verificou-se que os rebanhos DRB|*PstI* em
 283 ANG, MOX, MUR, PAR e SRD, e DRB|*TaqI* em MUR, PAR e SRD encontraram-se
 284 fora do EHW ($p < 0,05$) para o gene GoLA-DRB.2, demonstrando que as frequências
 285 observadas diferem significativamente das frequências esperadas (Tabela 6). Dongxiao
 286 e Yuan (2004) também observaram rebanhos fora do EHW quando avaliando genótipos
 287 de quatro raças Chinesas. Zhao et al. (2011) observaram que todas as 10 raças Chinesas
 288 de caprinos estudadas foram significativas ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$) para o EHW. Os desvios
 289 das proporções do EHW observados podem ser explicados pela presença de alelos nulos
 290 não detectados, acasalamentos dirigidos, presença de ancestrais comuns, seleção contra
 291 heterozigoto, migração e os efeitos da deriva genética.

292

293 **Tabela 6.** Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), equilíbrio de Hardy-
 294 Weinberg em cabras leiteiras de diferentes padrões raciais.

Locus	Padrão racial	Ho	He	EWH (valor <i>p</i>)
DRB <i>PstI</i>	ANG	0,0000	0,5275	0,0118
	MAR	0,0000	0,0000	-
	MOX	0,0263	0,2116	0,0000
	MUR	0,0435	0,5072	0,0000
	PAR	0,0556	0,2426	0,0002
	SPRD	0,0448	0,5033	0,0000
DRB <i>TaqI</i>	ANG	0,0000	0,0000	-
	MAR	0,1000	0,2684	0,1582
	MOX	0,0526	0,1010	0,0809
	MUR	0,1739	0,4870	0,0025
	PAR	0,0278	0,0810	0,0421
	SPRD	0,2836	0,4158	0,0156

295 Legenda: ANG = Anglo Nubiana; MAR = Marota; MOX = Moxotó; MUR = Murciana;
 296 PAR = Parda Sertaneja; SPRD = Sem padrão racial definido; Ho = homozigosidade
 297 observada; He = homozigosidade esperada; EWH = Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

298

299 Na Tabela 7 são apresentados a análise de variância molecular (AMOVA) e os
300 parâmetros de estrutura da população através dos índices de fixação da estatística F de
301 Wright (F_{ST} , F_{IS} e F_{IT}) para os alelos polimórficos de todos os indivíduos amostrados.

302 Para a avaliação da diferenciação genética entre as subpopulações (raças),
303 observou-se valor de F_{ST} médio e significativo ($p < 0,01$) na análise com as enzimas de
304 restrição *PstI* (0,1693) e *TaqI* (0,1349). Os valores encontrados indicam diferenciação
305 genética entre as raças avaliadas e, provavelmente, não houve troca de material genético
306 entre as raças, exceto quando nos referimos à população SPRD.

307 Observaram-se valores da endogamia intrapopulacional (F_{IS}) alto e significativo
308 ($p < 0,01$), demonstrando o alto grau de consanguinidade dos indivíduos dentro da
309 população e uma redução significativa de heterozigotos. Este fato pode estar
310 relacionado à amostragem realizada, uma vez que foram coletadas amostras de animais
311 com parentescos recentes, além de um manejo reprodutivo visando o melhoramento
312 animal, com utilização de poucos reprodutores para compor os rebanhos, limitando a
313 variabilidade genética e fixando determinado alelo. O menor valor de F_{IS} foi observado
314 quando se utilizou a enzima de restrição *TaqI* (0,4489), sendo esta capaz de oferecer
315 melhores informações da diversidade dentro de cada população.

316 Os valores de F_{IT} foram significativos ($p < 0,01$) para os dois locus avaliados, com
317 valores iguais a 0,9132 (*PstI*) e 0,5233 (*TaqI*). Este valor elevado sugere a existência de
318 subdivisão entre as populações estudadas, sendo uma provável causa os acasalamentos
319 direcionados para efeito de melhoramento genético.

320 Essa subdivisão entre as raças direciona o estudo de diversidade genética para a
321 porcentagem de variação entre e dentro da população. Dessa forma, a AMOVA
322 demonstrou variação genética significativa ($p < 0,01$) entre raças, entre indivíduos da
323 mesma raça e dentro da população. A maior variação observada para DRB/*PstI* foi entre
324 indivíduos de uma mesma raça, sendo esta igual a 74,38%. Para DRB/*TaqI* observou-se
325 maior valor para análise de variação dentro da população (47,67%). A variabilidade
326 entre as raças foi menor do que aquela entre os animais dentro da mesma raça, já que
327 existe uma maior variabilidade genética dentro de uma população do que entre
328 populações distintas, além de se tratar de rebanhos contendo animais puros e cruzados.
329 Em um estudo realizado por Serrano et al. (2004) sobre a distância e a variabilidade
330 genética entre e dentro de raças bovinas, observou-se que a maior parte da variabilidade
331 genética (70,04%) também foi devido a diferenças entre indivíduos dentro da mesma
332 população, enquanto o restante (29,96%) estava relacionada às diferenças entre raças.

333 Os resultados do presente estudo podem estar associados à variabilidade genética nas
 334 diferentes raças avaliadas, podendo estas ser devido à sobreposição de gerações, à
 335 mistura de populações de diferentes localizações geográficas, ou subdivisão
 336 acompanhada de deriva genética (Naderi et al., 2007). Além disso, a região Nordeste é
 337 rica em cabras com raças que variam o seu potencial genético para produção de carne e
 338 leite.

339

340

341 **Tabela 7.** Análise de variância molecular e estatística de Wrigth nos padrões raciais.

Locus	Fonte de Variação	GL	Variação (%)	F's de Wrigth
DRB PstI	Entre raças	5	16,93	$F_{ST} = 0,1693^{**}$
	Entre indivíduos dentro da raça	175	74,38	$F_{IS} = 0,8955^{**}$
	Dentro da população	181	8,68	$F_{IT} = 0,9132^{**}$
Total		361	100	–
DRB TaqI	Entre raças	5	13,49	$F_{ST} = 0,1349^{**}$
	Entre indivíduos dentro da raça	175	38,84	$F_{IS} = 0,4489^{**}$
	Dentro da população	181	47,67	$F_{IT} = 0,5233^{**}$
Total		361	100	–

342 Legenda: GL = Graus de Liberdade; ^{**} Significativo a 1% ($p < 0,01$),

343

344

345 Influência do genótipo e haplótipo nas características do leite

346

347 Uma vez que o gene GoLA-DRB.2 está envolvido com o sistema imunológico, se
 348 faz necessária uma pesquisa que busque a associação deste com os parâmetros de
 349 qualidade do leite com maior resistência a mastite (Petlane et al., 2012). Com esse
 350 intuito, buscou-se investigar a associação das características de composição (gordura,
 351 proteína, caseína e lactose) e CCS com os genótipos obtidos para o segundo éxon do
 352 gene GoLA-DRB, sendo os dados médios para essas características por genótipo e por
 353 haplótipos apresentados nas Tabelas 8 e 9.

354 **Tabela 8.** Valores médios das características de composição e contagem de células
355 somáticas (CCS) por genótipo em cabras leiteiras.

Locus	Genótipo	n	Médias dos parâmetros avaliados					Sólidos totais	CCS (x1000)
			Gordura	Proteína	Caseína	Lactose			
DRB PstI	AA	119	4,2194	3,6228	2,9809	4,1683	13,0519	2.269,05	
	AB	7	3,4893	3,0557	2,4500	4,2264	11,6850	2.091,79	
	BB	52	3,9720	3,2105	2,6389	4,2284	12,3470	1.362,89	
DRB TaqI	CC	133	4,1485	3,5117	2,8813	4,2107	12,8798	1.927,55	
	CD	26	4,2512	3,3985	2,7703	4,1862	12,9011	2.175,39	
	DD	19	3,7260	3,3703	2,7150	4,0326	12,0303	2.242,39	

356 Não diferiram significativamente ($p < 0,01$)

357

358

359 **Tabela 9.** Valores médios das características de composição e contagem de células
360 somáticas (CCS) por haplótipo em cabras leiteiras.

Haplótipo	N	Médias dos parâmetros avaliados					Sólidos totais	CCS (x1000)
		Gordura	Proteína	Caseína	Lactose			
AACC	101	4,2125	3,6528	3,0087	4,1882	13,0828	2.183,23	
AACD	13	4,5000	3,5083	2,8912	4,1133	13,3833	2.690,25	
AADD	10	3,9490	3,4700	2,8185	4,0405	12,3550	2.561,00	
ABCC	6	3,4230	3,0570	2,4600	4,1760	11,5590	2.493,90	
ABCD	2	3,6550	3,0525	2,4250	4,3525	12,0000	1.086,50	
ABDD	-	-	-	-	-	-	-	
BBCC	31	4,0651	3,1438	2,5506	4,2866	12,4578	1.036,15	
BBCD	12	4,1018	3,3463	2,7069	4,2314	12,5690	1.842,01	
BBDD	9	3,4783	3,2594	2,6000	4,0239	11,6694	1.849,50	

361 Não diferiram significativamente ($p < 0,01$)

362

363 Ao analisar a influência dos genótipos e dos padrões de haplótipos sobre os
364 valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína e CCS, observou-se que
365 estes não diferiram significativamente ($p < 0,01$) para os dois *loci* avaliados através da
366 análise de variância (dados não mostrados). Nascimento et al. (2006) em estudo do gene

367 DRB em vacas pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da raça Gir,
368 observaram associação desse gene com a produção de proteína, gordura e CCS. Foi
369 relatado também associação do gene DBR.2 com CCS em estudos com bovinos por
370 outros autores (Ledwige et al., 2001; Rupp et al., 2007). É importante destacar que as
371 características de composição e qualidade do leite são influenciadas não só por fatores
372 genéticos, mas também pela sanidade, nutrição, ambiente, manejo, dentre outros
373 (Langoni et al., 2012; Araújo et al., 2013). Esse é o primeiro trabalho no Brasil que
374 busca associação do gene GoLA-DRB.2 com características de composição e CCS em
375 caprinos.

376

377

378 **Conclusões**

379

380 O gene GoLA-DRB.2 foi polimórfico na avaliação com as enzimas *PstI* e *TaqI*,
381 podendo ser explorado para efeitos de seleção futura. No entanto, não desempenhou
382 efeitos sobre nenhuma das características de composição e contagem de células
383 somáticas avaliadas neste estudo, sendo recomendada a pesquisa de outros
384 polimorfismos nesse mesmo gene.

385 Novos trabalhos devem ser desenvolvidos para estudo dos polimorfismos de
386 genes de interesse, a fim de explorar a diversidade alélica e de obter incremento em
387 programas de melhoramento genético, permitindo a identificação e seleção de animais
388 que apresentam alelos que sejam mais interessantes de serem difundidos na população
389 de caprinos leiteiros no Nordeste do Brasil.

390

391

392 **Agradecimentos**

393

394 Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) – Estação experimental de
395 Sertânia e aos produtores rurais que permitiram as coletas das amostras. Às agências de
396 fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq e a FACEPE pelo
397 financiamento do projeto.

398

399

400 Referências bibliográficas

401

402 Ahmed, S & Othman, O.E (2006) APCR-RFLP method for the analysis of Egyptian
403 goat MHC Classe II DRB Gene, *Biotechnology* 5(1), 58-61.

404

405 Amills, M., Francino, O. & Sanchez, A. (1995) Nested PCR allows the characterization
406 of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene,
407 *Veterinary Immunology and Immunopathology* 48, 313-321.

408

409 Araújo, A.P., Oliveira, V.J., Siqueira, J.V.M., Mousquer, C.J., Freiria, L.B., Silva,
410 M.R., Ferreira, V.B., Silva Filho, A.S. & Santos, C.M.S. (2013) Qualidade do leite na
411 bovinocultura leiteira, *PUBVET* 7 (22), 1-26.

412

413 Baghizadeh, A., Bahaaddini. M., Mohamadabadi, M.R. & Askari, N. (2009) Allelic
414 variations in exon 2 of Caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat,
415 *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 6 (4), 454-459.

416

417 Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E,
418 & Noordaa, J.VD. (1990) Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids,
419 *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3), 495-503.

420

421 Chu, M.X., Ye, S.C., Qiao, L., Wang, J.X., Feng, T., Huang, D.W., Cao, G.L., Di, R.,
422 Fang, L. & Chen, G.H. (2012) Polymorphism of exon 2 of BoLA-DRB3 gene and its
423 relationship with somatic cell score in Beijing Holstein cows, *Molecular Biology*
424 *Reports* 39, 2909–2914.

425

426 Dietz, A.B., Cohen, N.D., Timms, L. & Kehrl, M.E. (1997) Bovine lymphocyte antigen
427 classII alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows.
428 *Journal of Dairy Science* 80, 406–412.

429

430 Dongxiao, S. & Yuan, Z. (2004) Polymorphisms of the Second Exon of MHC-DRB
431 Gene in Chinese Local Sheep and Goat, *Biochemical Genetics* 42, 385-390.

432

433 Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs
434 to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology*
435 *Resources* 10 (3), 64–567.

436

437 International Dairy Federation, Milk. Enumeration of somatic cells. IDF Standard
438 148A, Brussels. 1995. p. 8.

439

440 International Dairy Federation. Standards 141 B. Whole milk – Determination of milk
441 fat, protein and lactose content. Guide for the operation of mid-infrared instruments.
442 Brussels: IDF, 1996.

443

444 Langoni, H., Citadella, J.C.C., Machado, G.P., Faccioli, P.Y., Lucheis, S.B. & Silva,
445 A.V. (2012) Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina
446 subclínica, *Veterinária e zootecnia* 19 (1), 115-122.

447

- 448 Ledwige, S. A., Mallard, B. A., Gibson, J. P. Jansen, G.B. & Jiang, Z.H. (2001) Multi-
449 primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles, *Animal Genetics* 32,
450 219-221.
451
- 452 Magalhães, H. R., El Faro, L., Cardoso, V. L., Paz, C.C.P., Cassoli, L.D. & Machado,
453 P.F. (2006) Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e
454 sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa, *Revista*
455 *Brasileira de Zootecnia* 35 (2), 415-421.
456
- 457 Naderi, S., Rezaei, H. R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S.A., Naghash, H. R., El-
458 Barody, M. A. A., Ertugrul, O., Pompanon, F. & Econogene, C. (2007) Large-scale
459 mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high
460 diversity, *Plos One* 2 (10), 1-11.
461
- 462 Nascimento, C.S., Machado, M.A., Martinez, M.L., Silva, M.V.G.B., Guimarães,
463 M.F.M., Campos, A.L., Azevedo, A.L.S., Teodoro, R.L., Verneque, R.S., Guimarães,
464 S.E.F. & Oliveira, D.A.A. (2006) Association of the bovine major histocompatibility
465 complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell
466 score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*), *Genetics and Molecular Biology* 29
467 (4), 641-647.
468
- 469 Paracha, H., Hussain, T., Tahir, M.Z., Yasmeen, A., Pervez, M.T., Sheikh, A.A.,
470 Haider, A., Ali, R. & Khan, W.A. (2015) Multifunctional DRB3, a MHC Class II Gene,
471 as a Useful Biomarker in Small Ruminants: A Review, *Journal of Infection and*
472 *Molecular Biology* 3, 19-23.
473
- 474 Petlane, M., Noor, R.R. & Maheswari, R.R.A. (2012) The Genetic Diversity of TLR4
475 MHC-DRB Genes in Dairy Goats Using PCR-RFLP Technique, *Media Peternakan* 35
476 (2), 91-95.
477
- 478 Radwan, J., Biedrzycka, A. & Babik, W. (2010) Does reduced MHC diversity decrease
479 viability of vertebrate populations? *Biological Conservation* 143 (3), 537-544.
480
- 481 Rupp, R. & Boichard, D. (2003) Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle,
482 *Veterinary Research* 34, 671-688.
483
- 484 Rupp, R., Hernández, A. & Mallard, B.A. (2007) Association of bovine leukocyte
485 antigen (BoLA) DRB3,2 with immune response, mastitis, and production and type traits
486 in Canadian Holsteins, *Journal of Dairy Science* 90, 1029-1038.
487
- 488 Sánchez, C.F.B. (2008) Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva
489 genética, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal
490 de Viçosa, Viçosa – MG.
491
- 492 SAS Institute INC, SAS/STAT User's Guide, Version 9,1,3, Cary (NC): SAS Institute
493 Inc, 2006.
494
- 495 Serrano, G.M., Egito, A.A., McManus, C. & Mariante, A.S. (2004) Genetic diversity
496 and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesquisa Agropecuária*
497 *Brasileira* 39, 543-549.

- 498
499 Shook, G.E. & Schutz, M.M. (1994) Selection on somatic cell score to improve
500 resistance to mastitis in the United States, *Journal of Dairy Science* 77 (2), 648-658.
501
- 502 Shrivastava, K., Kumar, P., Sahoo, N.R., Kumar, A., Khan, M.F., Kumar, A., Prasad,
503 A., Patel, B.H.M., Nasir, A., Bhushan, B. & Sharma, D. (2015) Genotyping of major
504 histocompatibility complex Class II DRB gene in Rohilkhandi goats by polymerase
505 chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing,
506 *Veterinary World* 8(10), 1183-1188.
507
- 508 Singh, P.K., Singh, M.K., Saxena, V.K., Singh, A.V. & Sohal, J.S. (2012) Genetic
509 analysis of MHC Class II DRB gene in an endangered Jamunapari breed os goat, *Indian*
510 *Journal of Biotechnology* 11, 220-223.
511
- 512 Yadav, A.K.; Tomar, S.S.; Kumar, A.; Thakur, M.S. (2016) Association of caprine
513 lymphocyte antigen-DRB3 gene with gastrointestinal nematode resistance in Sirohi and
514 Barbari breeds of goat. *Indian Journal of Animal Research* 50 (6), 958-963.
515
- 516 Zhang, F.Q., Zheng, X.M., Tang, D.W., Zhao, P., Shi, Y.G. (2007) Research on
517 polymorphism of BoLA-DRB3 gene in Holstein and the relationship between different
518 genotypes and resistance to dairy mastitis. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 38,
519 115–119.
520
- 521 Zhao, Y., Xu, H., Shi, L. & Zhang, J. (2011) Polymorphisms in Exon 2 of MHC Class II
522 DRB3 Gene of 10 Domestic Goats in Southwest China, *Asian-Australasian Journal of*
523 *Animal Sciences* 24 (6), 752-756.